

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude du rôle du récepteur aux œstrogènes α (ER- α) dans la croissance des cellules souches cancéreuses (CSCs) en conditions hypoxiques

Detraux, Damien

Award date:
2015

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**Etude du rôle du récepteur aux Œstrogènes α (ER- α) dans la croissance des
cellules souches cancéreuses (CSCs) en conditions hypoxiques**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Damien DETRAUX

Janvier 2015

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Etude du rôle du récepteur aux œstrogènes α (ER- α) dans la croissance des cellules souches cancéreuses (CSCs) en conditions hypoxiques

DETRAUX Damien

Résumé

Même si les progrès dans le traitement du cancer du sein (BC) ont contribué à réduire la mortalité liée à cette maladie (à moins de 15 % après 5 ans), une rechute est malheureusement observée chez plus de 40 % des patientes. De nombreuses études publiées ces 10 dernières années suggèrent que les cellules souches cancéreuses (CSCs) pourraient jouer un rôle essentiel dans ce processus ainsi que dans la résistance aux traitements chimio- et radio-thérapeutiques. Elles constituent donc une nouvelle cible des chercheurs. ER- α , surexprimé dans 70 % des cancers du sein est fortement impliqué dans la croissance tumorale par sa régulation de gènes influençant la division cellulaire. Une diminution de concentration en oxygène à 1% d'O₂ (hypoxie) est connue comme favorisant l'activité des CSCs, en particulier dans les BC ER- α positifs. L'objectif de cette étude était de caractériser le rôle que joue ER- α dans la croissance de ces CSCs en hypoxie modérée (5% d'O₂) et sévère (1% d'O₂). Cette recherche s'est effectuée en utilisant la lignée cellulaire MCF-7, surexprimant ER- α , en conditions non adhérentes pour former des mammosphères (MS). Cette culture particulière permet d'enrichir la population en CSCs en exploitant la capacité de celles-ci à résister à l'anoïkis lors de la culture en suspension. Cette étude a permis de mettre en évidence qu'après 24 h en culture non-adhérente, les MS sont bien enrichies en CSCs. En plus, l'hypoxie semble augmenter l'activité des CSCs, comme suggéré par le nombre de MS secondaires formées, principalement en hypoxie modérée. En ce qui concerne ER- α , nos résultats suggèrent que l'hypoxie affecte l'expression de son ARNm, l'abondance de la protéine ainsi que son activité. Il semble qu'en hypoxie modérée ces deux paramètres soient augmentés. Finalement, des résultats préliminaires suggèrent qu'ER- α réprime l'expression de Sox2, un facteur de transcription des cellules souches et CSCs, et augmente l'expression de CD44, un marqueur de surface des CSCs.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2015

Promoteur: Bruno Flamion

Remerciements

La remise de ce mémoire représente l'apogée de mon parcours universitaire, pour l'obtention du master en biologie. Y ajouter un point final implique donc la fin d'une aventure riche en émotions. Cela signifie surtout la fin d'une année de mémoire au sein d'une équipe chaleureuse, qui m'aura permis de grandir et de me préparer de la meilleure des façons à la vie professionnelle.

J'aimerais commencer tout d'abord remercier Bruno Flamion pour son accueil au sein de son laboratoire, merci pour son temps plus que précieux et merci surtout pour les conseils qui ont guidés ce mémoire à son terme.

Je tiens également à remercier chaque membre de mon jury, Jean-Pierre Gilet, Carine Michiels, Abdallah Mound et Anaïs Wanet, pour leur lecture attentive de mon mémoire.

Ma gratitude s'adresse spécialement à Guillaume Van Beersel pour son encadrement tout au long de l'année. Je sais que je n'ai pas spécialement été des plus faciles à encadrer mais tes conseils et surtout ton expérience font de toi une personne de choix pour guider le jeune étudiant que je suis. Merci pour le temps énorme que tu as su consacrer à mon travail et aux multiples corrections, surtout sur les deux derniers mois. Tes remarques toujours pertinentes m'ont permis d'avancer et de me rendre autonome au sein de l'équipe. Merci pour ton encadrement, mais merci aussi pour la bonne humeur que tu as apporté à l'équipe au cours de cette année.

Je ne peux remercier Guillaume sans remercier son binôme, Florence Noël, qui était aux premières loges pour me guider et pour me fournir l'expérience dont j'avais besoin. J'espère que mes questions n'ont pas été trop fréquentes ! L'autonomie que j'ai pu acquérir au laboratoire est également de son fait.

Le reste de l'équipe a également droit à sa part de remerciements. Merci à Stéphanie et à Sophie pour leur aide et pour leur disponibilité quand j'en avais besoin. Merci également à Charlotte et à Delphine pour ces derniers mois, pour l'ambiance que vous avez apporté dans l'équipe et pour toutes ces pauses qu'on a pu passer ensemble. Merci aussi à Martine qui était toujours disponible pour répondre à mes (nombreuses) questions techniques et pour discuter de longs moments durant mes pauses. Une assez grande partie de ce travail n'aurait sans doute pas été possible sans toi non plus. Je n'oublie évidemment pas Camille, Jean-François, Virginie et Cécile pour l'aide ponctuel qui m'a été fourni et pour tout le reste que j'oublie sans doute.

Ensuite, j'aimerais remercier Jérémy Malaisse pour l'aide qu'il m'a apporté assez fréquemment. Je m'excuse encore pour tous les soucis que j'ai pu te causer.

Je ne sais pas si j'aurai pu survivre sans les encouragements toujours plus pertinents et affectueux de Marine. Surtout sur les dernières semaines de ce mémoire tu as toujours su être là. J'aimerais souligner que ton expérience et surtout ton temps auront contribué à la forme de ce mémoire et pour ça, je ne saurai te dire assez merci ! J'aimerais également remercier Dimitri, Gabrielle, Céline, Delphine et Nadège, pour l'équipe qu'on a pu former tout au long de ces 10 mois. Ensemble on a pu se serrer les coudes et arriver au terme de l'aventure. Que ce soit pour faire une pause ou pour discuter de sa recherche, vous étiez toujours là. Merci surtout à Delphine, Dimitri et Gaby pour les 5 années qu'on a passé ensemble. Elles étaient remplies de bonne humeur et de rire, c'est grâce à vous. Je n'oublie pas non plus Coralie et Julie pour le soutien fréquent que vous avez pu m'apporter mais surtout pour les nombreux moments qui ont pu me permettre de m'évader.

Ma sœur mérite également une mention sur cette page. Tu as su me soutenir du mieux que tu as pu alors que d'autres ne l'ont pas jugé nécessaire. Tu as toujours été là pour moi et je ne t'en remercie pas assez souvent.

J'en oublie sans doute beaucoup mais tant de gens ont contribué à l'aboutissement de ce travail qu'il n'est pas possible de citer tout le monde ici.

Un grand merci à tout le monde et surtout, bonne lecture !

Liste d'abréviations

ABC transporteur = ATP binding cassette
ABCB1 = P-glycoprotein
ABCC1 = multidrug resistance protein 1 = MRP1
ABCG2 = Breast cancer resistance protein = BCRP
ADN = Acide désoxyribonucléique
AF-1 = Activation factor 1
AF-2 = Activation factor 2
AI = Aromatase inhibitor
Akt = Protéine kinase B
Alda = Aldolase A
ALDH1 = Aldéhyde déshydrogénase 1
AMPc = Adénosine monophosphate cyclique
AP-1 = Activator protein 1
APS = Ammonium persulfate
ATP = Adénosine triphosphate
BC = Cancer du sein
BCSC = Cellules souches cancéreuses du sein
bHLH = Basic helix-loop-helix
BNIP3 = BCL2/Adenovirus E1B 19kDa Interacting Protein 3
BRCA1 = Breast cancer 1
BRCA2 = Breast cancer 2
CARM1 = Coactivator-associated arginine methyltransferase 1
CASP8 = Caspase 8
CD133 = Cluster de différenciation 133 = Prominine 1
CD24 = cluster de différenciation 24 = Heat stable antigen CD 24
CD29 = Intégrine β 1
CD326 = ESA = Epithelial surface antigen
CD44 = Cluster de différenciation 44 = Récepteur majeur de l'hyaluronan
Chek1 = Checkpoint kinase 1
c-Met = Hepatocyte growth factor receptor
CSC = Cancer stem cell
DBD = DNA Binding domain
DMEM = Dulbecco's modified eagle medium
DLA = DIGE (Difference Gel Electrophoresis) labelling buffer
DLL4 = Delta-like ligand 4
E2 = 17- β Estradiol
EGF = Epidermal growth factor
EGFR = Epidermal growth factor receptor
EG-VEGF = Endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor
EMT = Epithelial-mesenchymal transition
EPO = Erythropoietin
ER- α = Estrogen receptor α
ER- β = Estrogen receptor β
ERE = Estrogen responsive element
ESR1 = Estrogen receptor 1
FACS = fluorescence-activated cell sorting
FBS = Fetal bovine serum
FGFR2 = Fibroblast growth factor receptor 2

FISH = Fluorescence in-situ hybridization
 GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase
 Glut1 = Glucose transporter 1
 HER-2 = Human epidermal growth factor receptor 2
 hESC = Human embryonic stem cell
 HIF = Hypoxia inducible factor
 HIF1- β = ARNT = Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
 HRE = Hypoxia responsive element
 HSP70 = Heat shock protein 70 kDa
 HSP90 = Heat shock protein 90 kDa
 Hus1 = Checkpoint protein HUS1
 IAP-2 = Inhibitor of apoptosis protein 2
 IGF-1 = Insulin-like growth factor
 IGF-1R = Insulin-like growth factor receptor
 IgG = Immunoglobuline G
 IL-6 = Interleukine 6
 iPSC = Induced pluripotent stem cell
 ITGA6 = Intégrin α 6
 KLF4 = Kruppel-like factor 4
 LBD = Ligand binding domain
 Lin = Lineage marker
 LRP1 = Low density lipoprotein receptor-related protein 1
 LSP1 = Leucocyte-specific protein
 MAP Kinase = Mitogen-activated protein kinase
 MS = Mammosphere
 NAD(P)H = Nicotinamide adenin dinucleotide (phosphate)
 Nanog = Nanog homeobox
 Ncor = Nuclear receptor corepressor 1
 Nek1 = NIMA (never in mitosis, gene A) -related kinase 1
 NF- κ B = Nuclear factor- κ B
 NIX = BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like
 NOD/SCID = Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency
 NSC = Neural stem cell
 Oct-3/4 = Octamer-binding transcription factor 3/4
 p23 = Prostaglandin E synthase 3
 PBS = Phosphate buffer saline
 Pgk1 = Phosphoglycerate kinase 1
 PKA = Protein kinase A
 PR = Progesterone receptor
 Sca-1 = Stem Cell Antigen-1
 SDS = Sodium dodecyl Sulfate
 SERM = Selective estrogen receptor modulator
 Shh = Sonic Hedgehog pathway
 SMRT = Nuclear receptor corepressor 2
 Sox2 = SRY (Sex determining region Y)-box2
 SP-1 = Specificity protein 1
 SRC-1 = steroid receptor coactivator-1
 TAM = Tumor associated macrophage

Tbx3 = T-Box Transcription Factor TBX3
TEMED = Tétraméthyl éthylen diamine
TGF = Transforming growth factor
TGF β = Transforming growth factor β
TIC = Tumor initiating cell
TP53 = p53 = tumor protein p53
VEGF = Vascular endothelial growth factor
Wnt = Wingless integration site

Table des matières

Introduction.....	1
1. Organisation du sein et cancer.....	1
A. Organisation tissulaire normale	1
B. Cancer du sein.....	1
2. Le récepteur aux œstrogènes α	2
A. Structure.....	2
B. Voies d'activation.....	3
C. ER- α en tant que cible thérapeutique	4
3. Cellules souches	5
A. Cellules souches normales	5
B. Cancer stem cells (CSCs)	6
a. Généralités	6
b. Historique.....	6
c. Origine et fonction des CSCs.....	7
d. Isolation et purification des CSCs	8
e. CSCs et transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).....	9
4. Hypoxie	10
A. Généralités	10
B. Facteurs d'activation génique.....	10
C. Isoformes d'HIF- α	11
D. Effets de l'hypoxie sur ER- α	12
5. Relations entre ER- α , CSCs et hypoxie.....	12
6. Objectifs du mémoire	14
Matériel et méthodes.....	16
1. Culture cellulaire.....	16
2. Culture de mammosphères en conditions normoxique et hypoxiques.....	16
3. Extraction protéique et Western blot	17

A. Récupération des sphères	17
B. Extraction protéique et dosage	17
C. Préparation des échantillons	17
D. Coulage des gels	17
E. Migration électrophorétique.....	18
F. Transfert sur membrane	18
G. Révélation des protéines	18
4. Extraction d'ARN, rétro-transcription et PCR quantitative.....	19
A. Extraction et purification d'ARN.....	19
B. Rétro-transcription.....	19
C. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)	20
5. Formation de sphères primaires et secondaires.....	20
6. Mesure de l'activité transcriptionnelle d'ER- α	21
A. Transfection du plasmide rapporteur et formation de sphères	21
B. Récupération des sphères transfectées	22
C. Révélation de l'activité des luciférases	22
7. Analyse de l'activité de l'ALDH1	22

Résultats et discussion..... 24

1. Analyse de l'expression de différents marqueurs de CSCs dans des cellules adhérentes et MS incubées en normoxie ou hypoxie sévère ou modérée	24
2. Effets de l'hypoxie modérée et sévère sur la population de CSCs	25
3. Analyse de l'expression de marqueurs de l'EMT dans des cellules adhérentes et des mammosphères incubées pendant 24 h en normoxie et hypoxie	27
4. Analyse de l'effet de l'hypoxie modérée et sévère sur l'expression et l'activité d'ER- α dans des sphères incubées pendant 24 h en normoxie et hypoxie	29
A. Influence de la concentration en oxygène sur l'abondance protéique et du transcrit	29
B. Influence de la concentration en oxygène sur l'activité du récepteur	30

5. Analyse de du rôle d'ER- α dans l'expression de marqueurs de CSCs dans des mammosphères incubées pendant 24 h en normoxie et hypoxie	31
A. Détermination de la concentration de Fulvestrant à utiliser	31
B. Analyse du rôle d'ER- α dans l'expression de Sox2 et CD44 dans des mammosphères de 24h cultivés en normoxie ou hypoxie	31

Conclusions et perspectives..... 33

Bibliographie..... 37

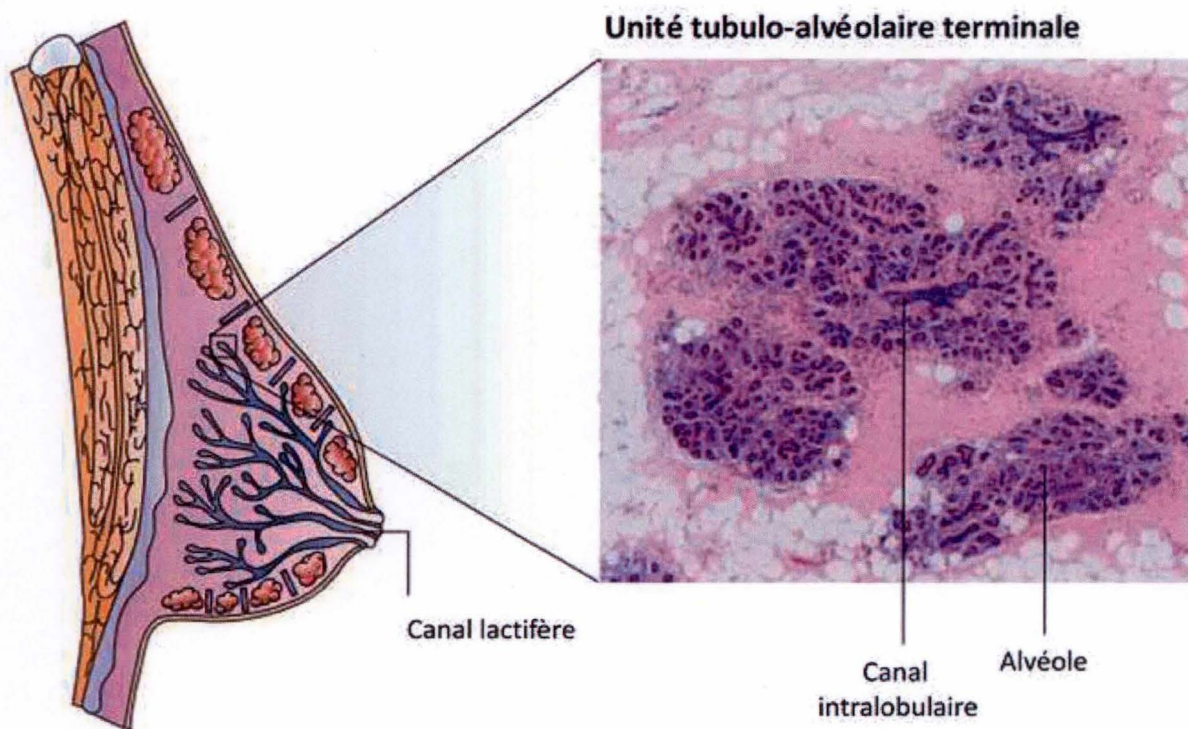


Figure 1 Organisation générale de la glande mammaire : La glande est composée de 15 à 20 lobes, chacun drainés par des canaux galactophores (ou lactifères) et aboutissant au mamelon. Ce réseau lobulaire est en fait composé d'un système canalaire s'infiltrant au sein du tissu de soutien. Ces canaux intralobulaires aboutissent à des structures terminales tubulo-alvéolaires qu'on appelle bourgeons alvéolaires et qui sont le siège de la production de lait en période d'allaitement. D'après (Smalley & Ashworth, 2003)

Introduction

1. Organisation du sein et cancer

A. Organisation tissulaire normale

En tant que glande exocrine présente chez les mammifères, la glande mammaire est le lieu de production et de sécrétion du lait destiné à la progéniture de la mère. Il s'agit d'un réseau lobulaire composé d'un système canalaire s'infiltrant au sein du tissu de soutien. Ces canaux intralobulaires aboutissent à des structures terminales tubulo-alvéolaires qu'on appelle bourgeons alvéolaires (Fig. 1). Au niveau cellulaire, la glande mammaire est constituée de trois types cellulaires différents : le bourgeon alvéolaire est formé d'une couche luminale de cellules sécrétrices cubiques ou cylindriques et entourées par une couche dite basale parfois discontinue de cellules myoépithéliales. Un troisième type de cellules est rencontré au sein des canaux, il s'agit des cellules ductales, composant la paroi des canaux lobulaire ¹⁻³. Il est important de noter que seules les cellules lumineales épithéliales expriment des récepteurs aux hormones stéroïdiennes comme le récepteur à l'œstrogène α (ER- α) auquel nous sommes plus particulièrement intéressés au cours de notre travail. ER- α , ainsi que le récepteur à la progestérone (PR), sont notamment impliqués dans l'hyperplasie de la glande et dans l'initiation de la sécrétion de lait en cas de grossesse ou d'allaitement ²⁻⁴. En effet, jusqu'à la puberté, la glande mammaire reste inactive et n'est constituée que d'un réseau assez pauvre de canaux simples et peu ramifiés. Son développement complet a lieu en réponse à la production d'œstrogènes ovariens. Ceux-ci induisent (à travers l'action du ER- α) la multiplication des canaux inter-lobulaires, mais aussi à la prolifération du tissu conjonctif sous-jacent. Au cours de la grossesse les tubulo-alvéoles sécrétrices se développent et se multiplient, répondant à la progestérone produite par le corps jaune ovarien. La lactation ne sera possible que grâce à la production de prolactine, hormone sécrétée *post-partum*. Enfin, après la ménopause le tissu sécrétoire et canalaire involue alors que le tissu conjonctif adjacent se densifie ^{3,5,6}.

B. Cancer du sein

Parmi tous les types de cancers répertoriés, le cancer du sein (Breast Cancer, BC) est le plus diagnostiqué chez la femme (World Health Organization – IARC, 2012), avec environ 1 676 000 nouveau cas détectés en 2012 (GLOBOCAN 2012). Même si les progrès réalisés ces dernières années en matière de traitement chimio thérapeutiques ont permis de réduire considérablement la mortalité liée au développement de ce type de cancer (à moins de 15 % après 5 ans (National Cancer Institute, 2014)), une rechute est malheureusement observée dans plus de 40% des cas. La maladie se déclare alors sous une forme plus agressive et compte pour la grosse majorité des décès liés au cancer du sein. Il est clair, à ce jour, que de nombreux facteurs prédisposent à l'apparition de la maladie. Parmi ceux-ci, le plus important est sans aucun doute le facteur génétique expliquant les cas de cancers familiaux. Dans ces cas de cancers héréditaires, les gènes mutés sont soit des régulateurs de premier ordre qui sont là pour maintenir l'intégrité du génome et sa réparation comme *BRCA1* (Breast cancer 1), *BRCA2* (Breast cancer 2) et *TP53* (tumor protein p53). À elles trois, ces protéines sont impliquées dans l'apparition d'environ 25% des cancers du sein ⁷. Des gènes à péné-

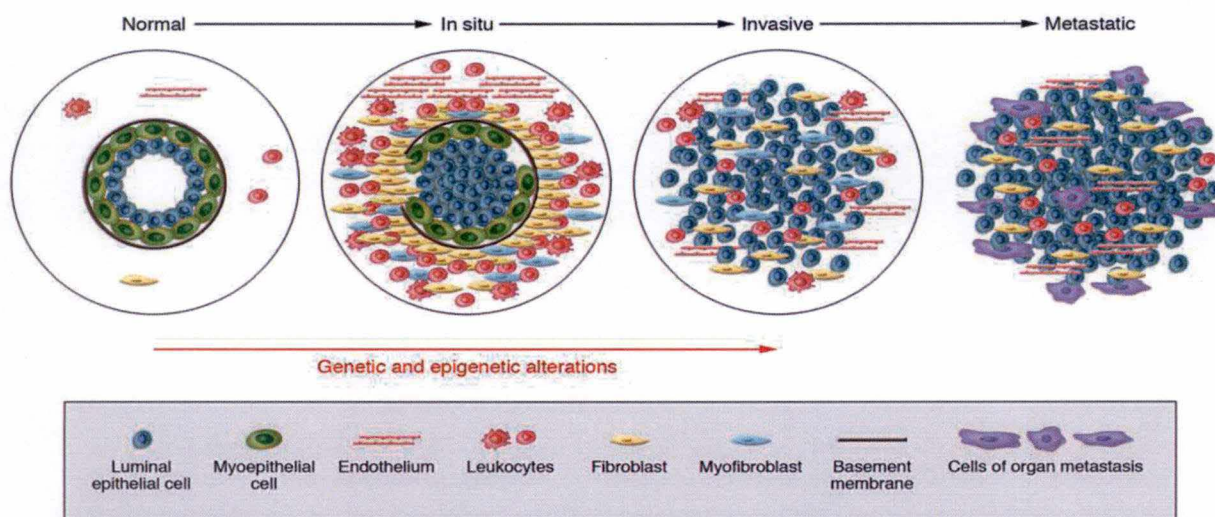


Figure 2 Représentation schématique des différents stades de progression du cancer du sein. Dans le tissu normal, les conduits sont distinctement séparés en 3 parties: la couche luminaire, la couche myoépithéliale et, derrière la lame basale, le stroma. Dans le cas d'un carcinome in-situ, la couverture de la couche myoépithéliale décroît et subit des altérations génétiques et épigénétiques et la couche luminaire envahit la lumière du conduit. De plus, le nombre de cellules leucocytaires, fibroblastiques et endothéliales augmente dans le stroma. Le dernier stade constitue une perte presque totale de la couche myoépithéliale, avec invasion du tissu environnant par les cellules tumorales. Ces cellules sont capables de finalement coloniser d'autres organes distants et former des métastases. (Polyak, 2007)

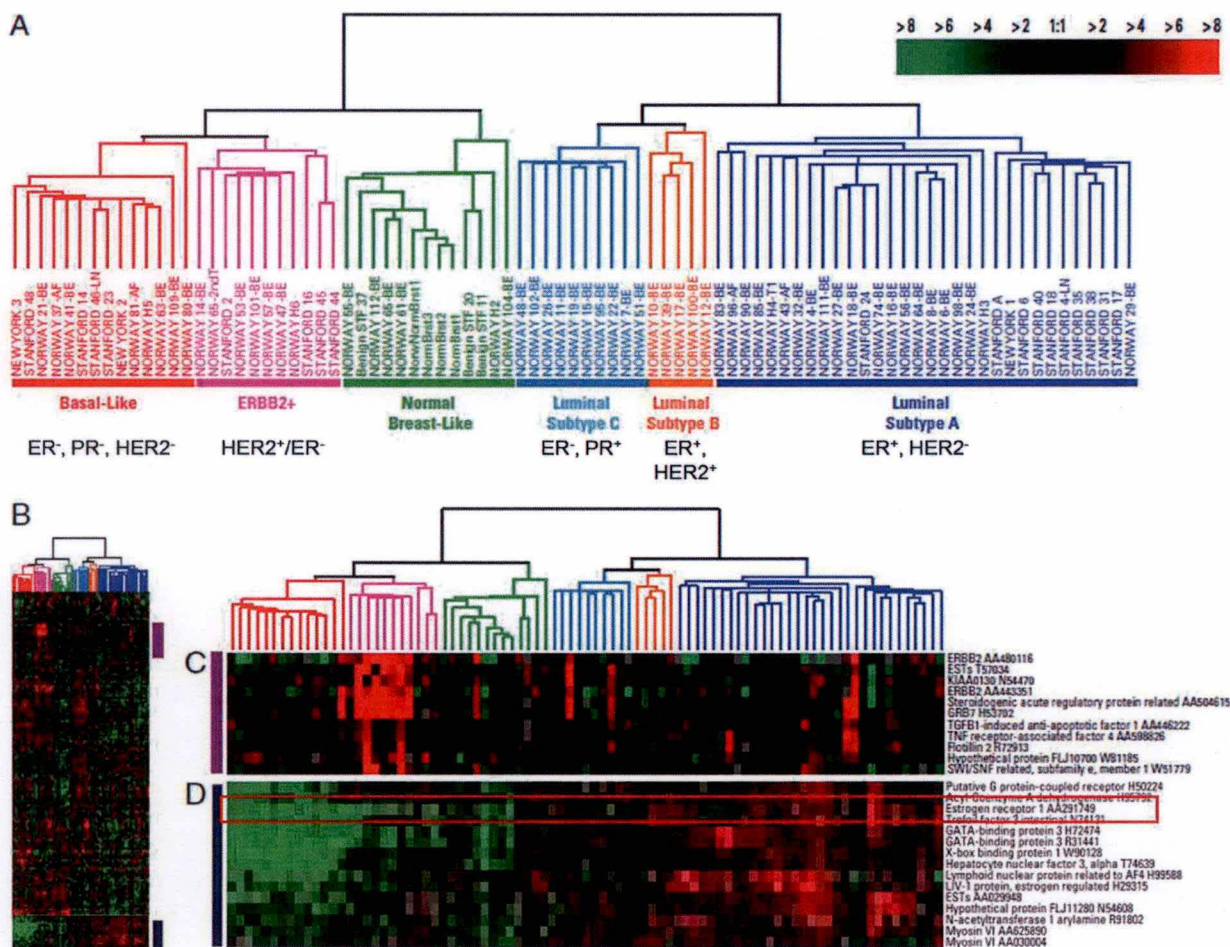


Figure 3 Dendrogramme de la classification des sous-types de cancer du sein basée sur l'expression génique observée par micro-array. En A les sous-types de cancers ont été subdivisés en groupes suivant leurs patterns d'expression génique et en fonction de l'expression de protéines marqueurs (le récepteur à l'œstrogène α , ER- α ; le récepteur à la progestérone, PR et le récepteur au facteur de croissance épithélial humain 2, HER2). En bleu foncé les « luminal A » (ER+, HER2-), en orange les « luminal B » (ER+, HER2+), en bleu clair, les « luminal C » (ER-, PR+), en rose les HER2+/ER- (ou ERBB2+), en rouge les « basal-like » (ER-, PR-, HER2-) et en vert les sous-types normaux. B, C et D montrent les résultats de l'analyse par micro-array des échantillons de tumeurs mammaires. En rouge l'expression est augmentée comparé à un tissu normal et en vert, l'expression est diminuée. L'encadré montre l'expression d'ER- α au sein des différents sous-types. D'après (Brenton, Carey, Ahmed, & Caldas,

trance faible ou modérée tels que par exemple le *FGFR2* (Fibroblast growth factor receptor 2), *CASP8* (caspase 8, impliquée dans la phase d'exécution de la mort cellulaire programmée, l'apoptose), ou encore *LSP1* (leucocyte-specific protein, impliquées dans la motilité des neutrophiles et leur migration trans-endothéliale) sont également susceptibles d'initier le cancer du sein ^{8,9}. Quoi qu'il en soit, à l'origine du cancer du sein (et du cancer en général) on retrouve une mutation affectant le génome d'une cellule. Celle-ci pourra alors proliférer au sein du tissu et peu à peu progresser en envahissant le tissu environnant. Dans le cas du cancer du sein, la première étape se limite à une hyperprolifération ductale. Ensuite, la pathologie évolue formant un carcinome ductal *in-situ* devenant de plus en plus invasif vis-à-vis du stroma environnant jusqu'à aboutir au stade métastatique pouvant toucher des organes distants (Fig. 2) ¹⁰. Les mutations initiatrices du BC peuvent aussi bien apparaître dans une cellule mammaire normale que dans une cellule souche mammaire, devenant alors une cellule souche cancéreuse (CSC) ou cellule initiatrice de tumeur (TIC). Ceci explique qu'en réalité, le cancer du sein est une pathologie extrêmement hétérogène, que ce soit au niveau intra- ou intertumoral. L'hétérogénéité intratumorale s'explique par la composition variable en cellules de la tumeur, allant des cellules mammaire normales à des macrophages associés aux tumeurs (TAMs), en passant par des CSCs, ces derniers conservant les propriétés uniques de cellules souches d'auto-renouvellement et de différenciation. Cette hétérogénéité intratumorale s'explique aussi par des changements génétiques et épigénétiques variables dans les différentes cellules, changements apparaissant de manière croissante au cours du temps. L'hétérogénéité intertumorale est quant à elle liée à l'origine de la tumeur et à la mutation initiatrice du processus de transformation ¹¹. Pour faciliter la compréhension, il existe des systèmes de classification des tumeurs mammaires basés sur des observations histologiques et immunohistochimiques, des analyses par micro-array ou par hybridation *in-situ* fluorescente (FISH). Le système de classification auquel nous nous référerons ici se base sur l'expression de protéines « marqueurs », détectés via des analyses en micro-array (Fig. 3) : ER- α , PR et le récepteur humain des facteurs de croissance épidermiques 2 (HER-2). On distingue donc 5 sous-groupes de cancers du sein : luminal A (ER+, HER2-), luminal B (ER+, HER2+), HER2+/ER-, basal-like (ER-, PR-, HER2-) et normal breast-like ^{12,13}. Dans le cadre de ce mémoire, notre attention s'est portée sur les cancers du sein (sur-)exprimant ER- α , représentant plus de 70% de tous les cas de BC ¹⁴.

2. Le récepteur aux œstrogènes α

A. Structure

Il existe au moins deux isoformes différentes du récepteur oestrogénique ; ER- α et ER- β . Ces dernières se distinguent non seulement par un profil d'expression tissulaire différent mais aussi par des fonctions antagonistes : alors qu'ER- α stimule la prolifération cellulaire par transcription du gène de la cycline D1 par exemple, ER- β diminue cette prolifération notamment par diminution de la transcription de ce même gène ^{15,16}. Alors qu'ER- α est exprimé de façon ubiquiste, ER- β n'est exprimé que dans certains tissus comme l'ovaire, la prostate, le poulmon, l'épididyme, l'hypothalamus ou le cerveau ¹⁷. Brièvement, l'extrémité NH₂-terminale d'ER- α se caractérise par la présence de différents domaines fonctionnels présentés à la figure 4 (A-F). Mentionnons, par exemple, le domaine (A/B) qui est essentiel à l'activité transactivatrice du récepteur. En effet, la région AF1 (activation function 1) présente dans ce dernier permet le recrutement de coactivateurs comme SRC-1 (Steroid receptor coactivator 1) ou p68 (une RNA hélicase). Le domaine A/B médie également la transcription ligand-in-

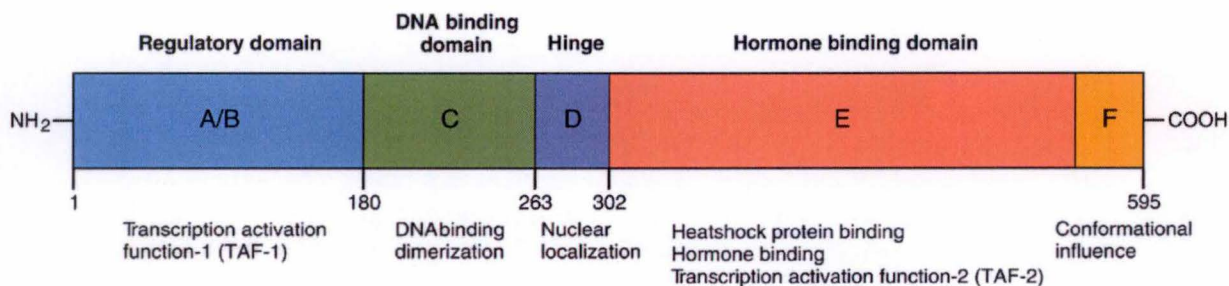


Figure 4 Représentation du récepteur oestrogénique α (ER- α). Le domaine A/B est responsable de la liaison de différents co-activateurs comme SRC-1, 2 ou 3 (Steroid receptor coactivator 1, 2 ou 3). Ces derniers permettent de recruter l'ARN polymérase III et initier la transcription de gènes. Le domaine C, par sa structure en doigt à zinc, permet la reconnaissance de sites spécifiques de l'ADN (ERE). Cette région est également responsable de la dimérisation du récepteur. Le domaine D contient la séquence de localisation nucléaire qui devient accessible au moment de la liaison du ligand. Le domaine E, en plus de son rôle dans la liaison des ligands, permet grâce au domaine AF-2 de recruter des co-activateurs et co-répresseurs tels que GRIP1 (glutamate receptor interacting protein 1), NCoR (nuclear corepressor) ou SMRT (nuclear co-repressor 2). Enfin, la fonction de la région F n'est pas encore claire. (Fritz & Speroff, 2010)

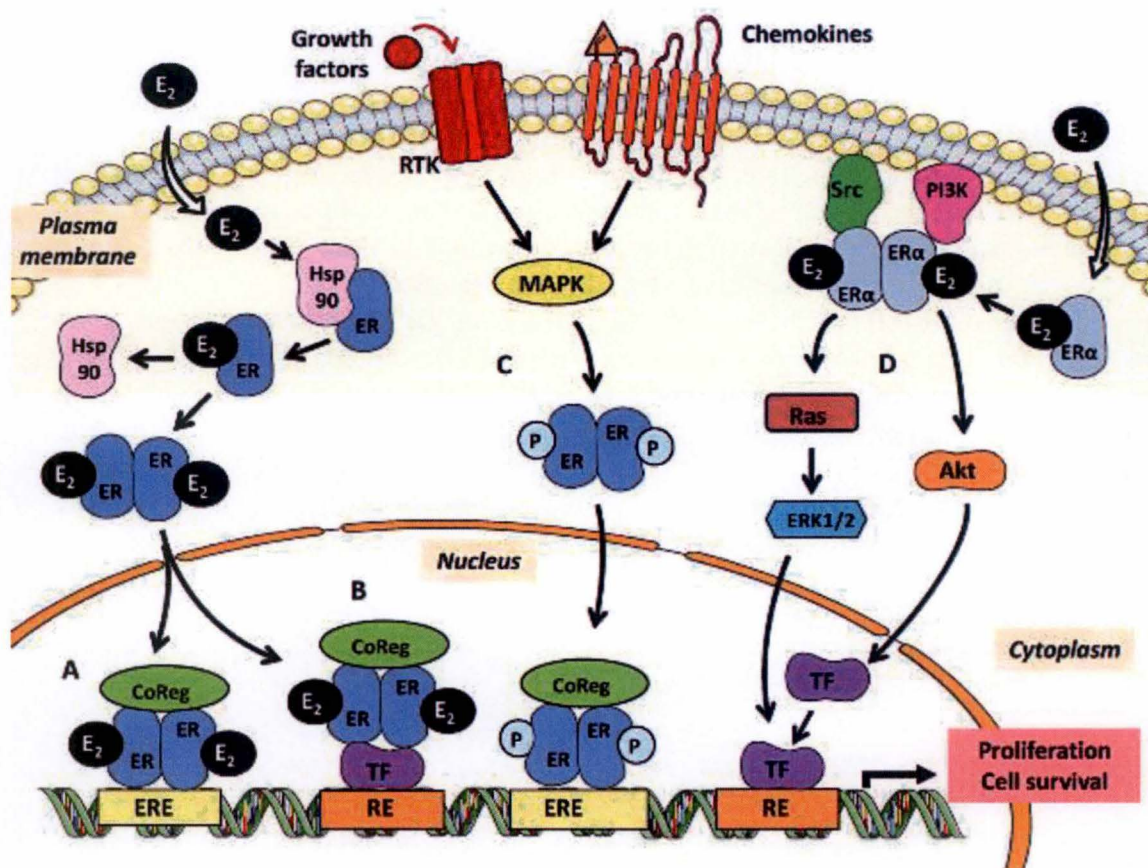


Figure 5 Voies d'activation d'ER- α . A gauche en (A), dans la voie classique, l'E₂ (17- β estradiol) pénètre dans les cellules par diffusion passive au travers de la membrane. La molécule lie le récepteur et induit, par changement de conformation, sa libération de protéines chaperonnes telles que Hsp90 (Heat-shock protéine 90 kDa). Dans le noyau, sous forme de dimère il peut agir tant que facteur de transcription de manière directe ou indirecte si cela implique la liaison à d'autres facteurs de transcription (TF), grâce à la liaison à différents cofacteurs (CoReg). Au centre, la voie d'activation ligand-indépendante implique la phosphorylation d'ER- α (Ser118) par des kinases de voies de facteurs de croissance (tels que Akt, la protéine kinase B, ou p38, une mitogen-activated protein kinase). Enfin, à droite en (D), la voie non classique ou non génomique d'activation d'ER- α . Des récepteurs situés en membrane ou à proximité peuvent activer des voies de signalisation intracellulaire telles que les MAP kinases (Mitogen associated protein) ou Akt en interagissant avec des protéines kinases (Src, protéine tyrosine kiase, ou la PI3K, la phosphoinositide 3-kinase). Cette voie est dite non génomique étant donné que l'initiation de la transcription sera indépendante des voies activée par ER- α . De manière globale ces voies aboutissent à l'expression génique favorisant la prolifération et la survie cellulaire. (Le Romancer et al., 2011)

dépendante d'ER- α . La liaison à l'ADN d'ER- α dépend quant à elle du domaine DBD situé dans la région C qui, grâce à son motif en doigt à zinc, riche en cystéines, permet la reconnaissance des séquences consensus appelées Estrogen Response Elements (ERE) représentant typiquement une séquence 5'-C(A/G)GGTCAnnnTGACC(T/C)G-3' ^{18,19} dans la région promotrice de ses gènes cibles. Enfin, le domaine E constitue le site de liaison des ligands (comme le 17- β estradiol, E2) et des différents co-activateurs et co-répresseurs (domaine AF2) impliqués dans l'initiation de la transcription des gènes cibles, de manière ligand-dépendante (Fig. 4) ²⁰.

B. Voies d'activation

ER- α est un récepteur nucléaire. De manière générale, il s'agit donc d'une protéine cytoplasmique qui, en réponse à la liaison de son ligand, peut transloquer vers le noyau et agir en tant que facteur de transcription ²¹.

ER- α est capable de lier une variété de composés polycycliques tels que le 17- β estradiol, l'estrone ou l'estriol. Nous allons nous focaliser ici sur l'E₂, l'une des hormones stéroïdienne impliquée dans la croissance de la glande mammaire ² car nous l'avons utilisé à plusieurs reprises au cours de notre travail. Mécanistiquement, après diffusion membranaire de l'hormone, celle-ci se lie au récepteur présent dans le cytoplasme et induit sa libération de protéines chaperonnes. En effet, dans le cytoplasme ER- α est associé à différentes protéines chaperonnes comme la HSP90 (heat shock protein de 90 kDa), HSP70 (heat shock protein de 70 kDa) ou encore p23 (Prostaglandin E synthase 3) ^{22,23}. Ces dernières assurent notamment la bonne conformation du récepteur et préviennent son agrégation et sa dégradation protéasome-dépendante en absence de ligand ²³. Une fois lié à son ligand et libéré des chaperonnes, la conformation du récepteur est telle qu'elle lui permet de se dimériser pour alors former l'entité transcriptionnellement active une fois transloquée dans le noyau. Le dimère reconnaît alors les ERE dans la région promotrice de ses gènes cibles (Fig. 5) ^{20,24}. Cette action transcriptionnelle s'effectue de concert avec la présence de nombreux co-activateurs (tels que les SRC-1, -2 et -3 (steroid receptor coactivator-1, -2 or -3 ²⁴)) et co-répresseurs (comme NCoR (nuclear receptor corepressor 1) ou SMRT (Nuclear Receptor Corepressor 2) ²⁵). Ces protéines interagissent directement avec les sous-unités d'ER- α sur les régions AF-1 et -2 et, dans le cas des co-activateurs, améliorent l'efficacité du recrutement de l'ARN-polymérase au site d'initiation. Il est important de mentionner qu'en plus de cette voie de signalisation « classique », ER- α a également été décrit comme pouvant moduler l'expression de gènes à travers de voies alternatives (ou « non classique »), quand l'ERE n'est pas conventionnel. Ces dernières impliquent la formation de complexes de facteurs de transcription avec notamment SP-1 (specificity protein 1) et AP-1 (activator protein 1) ²⁶. C'est le cas du gène codant pour l'IGF-1 (Insulin-like growth factor) par exemple ²⁷. Deuxièmement, il existe une voie d'activation non-génomique : elle implique des complexes ER- α -E₂ activant des récepteurs comme celui de l'IGF-1 et menant à l'activation de voies de transduction intracellulaires, par exemple la voie des MAP Kinases (Mitogen-activated protein) et Akt (protéine kinase B) et aboutissant notamment à la prolifération cellulaire ^{28,29}. Troisièmement, l'activation d'ER- α peut se faire de façon ligand-indépendante (Fig. 5). En effet, la connexion entre la voie des MAP kinases ou de l'IGF et ER- α fonctionne aussi dans l'autre sens : une activation d'ER- α par ces kinases en réponse à un signal autre qu'un ligand du récepteur nucléaire. Il a été montré que la phosphorylation d'ER- α sur sa sérine 118, activant celui-ci, pouvait être induite par l'IGF-1R en réponse à sa propre activation par l'IGF-1. Cette activation résulte, dans des MCF-7, en la transcription ER- α dépendant de ses gènes cibles, bien que la signalisation

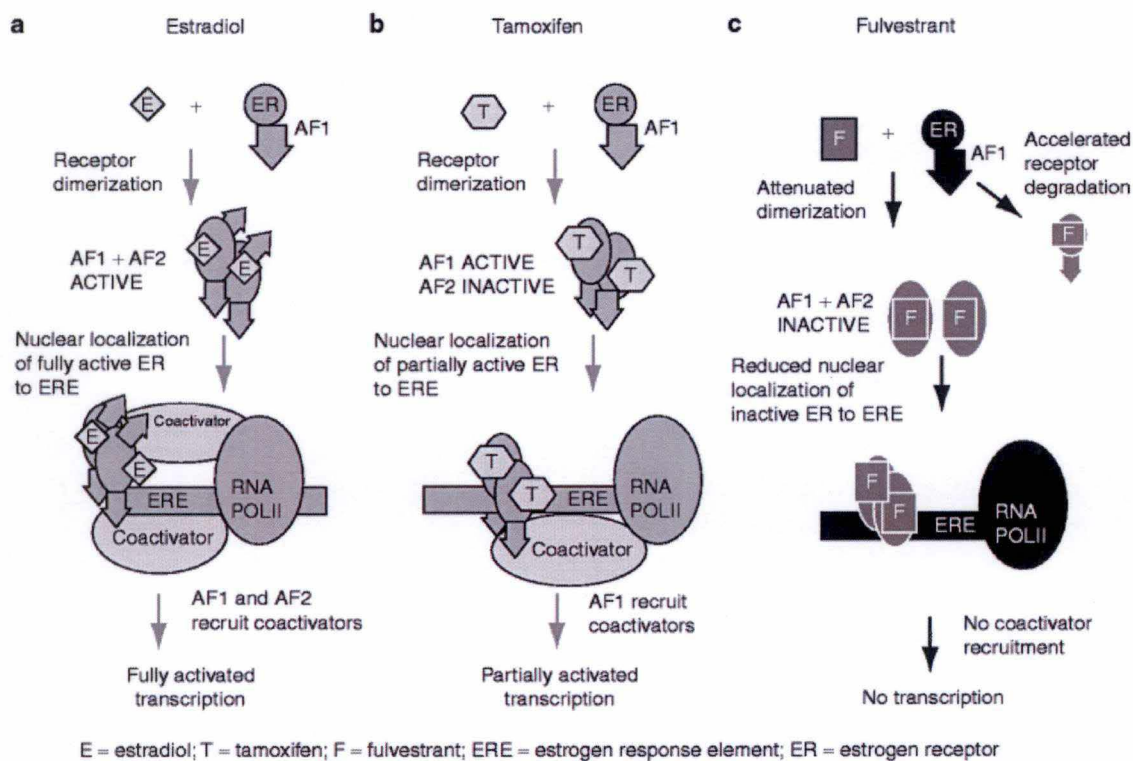


Figure 6 Schéma d'action de l'estradiol, du Tamoxifen et du Fulvestrant sur l'activité d'ER-α. En a, activation d'ER-α par l'un de ses ligands naturel, l'estradiol. La liaison de l'estradiol au récepteur permet aux domaines AF-1 et AF-2 (Activation factor -1 ou -2) de recruter des activateurs et ainsi permettre une transcription complète. En b, en présence du Tamoxifen, le récepteur sera dans une conformation intermédiaire ne recrutant pas des co-activateurs d'au niveau d'AF-1. La réponse est alors dépendante du type cellulaire et des co-activateurs présents dans la cellule. Enfin, en c, un antagoniste pur exerce plusieurs effets sur le récepteur, favorisant sa dégradation, et en cas de translocation dans le noyau, les domaines AF-1 et AF-2 ne recrutent pas de co-activateurs, empêchant ainsi la transcription ER-α-dépendante. (Buzdar, 2004)

TABLE 1. Effects of hormones, hormone receptor modulators, and growth factors on ER expression

Agent	Class/pathway	Tissue/cell line ^a	ER mRNA	ER protein	Reference(s)
Estradiol	Estrogen	MCF-7	Increase	Decrease	37, 49
		Endothelium	Increase	Decrease	26, 64
		Hypothalamus	Increase	Increase	58
		Osteoblast	Increase		15, 16
ICI 182 780	Estrogen antagonist	MCF-7	No effect	Decrease	4
Tamoxifen		MCF-7	No effect		67
		Uterus		Decrease	9
Raloxifene	SERM	MCF-7	Increase		67
ORG 2058	Progesterone agonist	T47D	Decrease		53
R5020	Progesterone agonist	T47D and MCF-7		Decrease	1, 53
RU486	Progesterone antagonist	T47D and uterus		Increase	39, 53
Danazol	Progestogen/estrogen antagonist	PBMC	Decrease	Decrease	20, 63
Flutamide	Androgen antagonist	Prostate		Increase	34
1,25(OH) ₂ D ₃	Vitamin D	MCF-7	Decrease	Decrease	58, 62
EB-1089	Vitamin D agonist	MCF-7	Decrease	Decrease	62
KH-1069	Vitamin D agonist	MCF-7	Decrease	Decrease	62
Ro 27-0574	Vitamin D agonist	MCF-7	Decrease	Decrease	62
Ro 23-7553	Vitamin D agonist	MCF-7	Decrease	Decrease	62
hCG	Gonadotropin/PKA	Ovary	Decrease	Decrease	8
EGF	Growth factor/PKB	MCF-7	Decrease	Decrease	11, 59
D-Ala-GnRH	GnRH agonist/PKC	Ovary	Decrease	Decrease	8
Insulin	Insulin/IGF-1	MCF-7		Increase	2
IGF-I	Insulin/IGF-1	MCF-7	Decrease	Decrease	60

^a PBMC, peripheral blood mononuclear cells.

Tableau 1 Effet des hormones, des modulateurs de récepteurs hormonaux et de facteurs de croissance sur l'expression d'ER-α (Pinzone, Stevenson, Strobl, Berg, & Virginia, 2004)

induite soit totalement ligand-indépendante³⁰. Le même effet est obtenu par l'activation de l'EGFR. Cette fois, la cascade des MAP kinases induit la phosphorylation d'ER- α et son activation subséquente³¹. De plus, Carascossa et *al.*³², ont également montré que dans des cellules MCF-7, l'activité d'ER- α augmentait en réponse à une élévation de la concentration cytosolique en AMPc. Ce dernier activerait la kinase PKA (protéine kinase A) qui a son tour phosphorylerait la protéine CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1) sur sa sérine 448³². Une fois phosphorylé, CARM1 serait alors capable d'interagir physiquement avec ER- α et de l'activer. Il en résulte alors un recrutement des protéines coactivatrices du récepteur nucléaire et donc une activation de la transcription génique³².

C. ER- α en tant que cible thérapeutique

ER- α régule l'expression de gènes notamment impliqués dans la croissance cellulaire comme les gènes codants pour des facteurs de croissance (EGF, epidermal growth factor ou TGF, transforming growth factor³³), de leurs récepteurs (EGFR^{24,33}) ou encore de la cycline D1, impliquée dans la division cellulaire³⁴. Le récepteur joue donc un rôle dans la prolifération mais aussi dans la différenciation cellulaire^{35,36}. On peut donc aisément comprendre qu'une augmentation de l'expression et/ou de l'activité de ce dernier puisse mener à une hyper-prolifération cellulaire et puisse donc jouer un rôle dans l'établissement d'une tumeur. Cette protéine constitue donc une cible intéressante dans le cadre de traitement chimio-thérapeutique ciblant les tumeurs mammaires ER+. Différentes molécules sont connues comme régulant l'activité de ce récepteur. La plus connue est sans doute le Tamoxifen (un SERM; Selective Estrogen Receptor Modulator, un modulateur sélectif) qui inhibe l'activité d'ER- α en se substituant à l'E₂ au niveau du domaine de liaison LBD du récepteur. Avec son effet de modulateur sélectif, le Tamoxifen modifie la conformation du récepteur de telle façon qu'il sera dans un « état transitoire », oscillant entre le recrutement de co-activateurs ou de corépresseurs (Fig. 6)³⁷. Le Tamoxifen pourra donc exercer un rôle agoniste ou antagoniste d'ER- α , en fonction des conditions et des tissus. Au niveau de l'endomètre notamment, le Tamoxifen aura un effet agoniste de la fonction des œstrogènes, effet pouvant même aller dans certains cas à l'induction de cancers endométriaux³⁸. Face aux problèmes que posent le Tamoxifen, une nouvelle génération d'anti-oestrogènes a été développée. Le Fulvestrant (Faslodex ©, ICI 182 780), à l'inverse du Tamoxifen, n'a qu'une action antagoniste sur ER- α . On parle dans son cas d'antagonisme pur. À l'instar du Tamoxifen, le Fulvestrant est capable de lier ER- α au niveau de son domaine LBD, mais avec une efficacité bien meilleure que celui-ci. L'action de la drogue sur le récepteur consiste en 3 parties : Premièrement, le Fulvestrant lié à l'un des monomères α va empêcher celui-ci de dimériser et transloquer dans le noyau. Ensuite, le complexe ER-Fulvestrant est instable, ce qui va favoriser la dégradation du récepteur tout entier et ainsi jouer le rôle d'une downrégulation sur le récepteur lui-même. Il est important de mentionner que l'abondance d'ER- α est influencée par bien d'autres molécules (Table 1). Enfin, le Fulvestrant lié au récepteur ER- α diminue le taux de translocation du complexe vers le noyau et empêche le recrutement des facteurs d'activation AF-1 et AF-2, ce qui a pour rôle d'inhiber la transcription ligand-dépendante. Le Fulvestrant est donc un antagoniste pur du récepteur oestrogénique α avec, pour le moment, aucune activité agoniste découverte comme ce fut le cas du Tamoxifen (Fig. 6)³⁹⁻⁴¹. Mentionnons qu'en plus de ces agents ciblant le récepteur lui-même, il existe également des molécules ciblant plutôt l'aromatase, enzyme responsable de la conversion de la testostérone en E₂^{42,43}. Pour une revue complète des traitements endocriniens actuellement utilisés, voir⁴⁴. Aujourd'hui, les recherches de traitements s'orientent vers le ciblage des CSCs^{4,11,45} responsables notamment

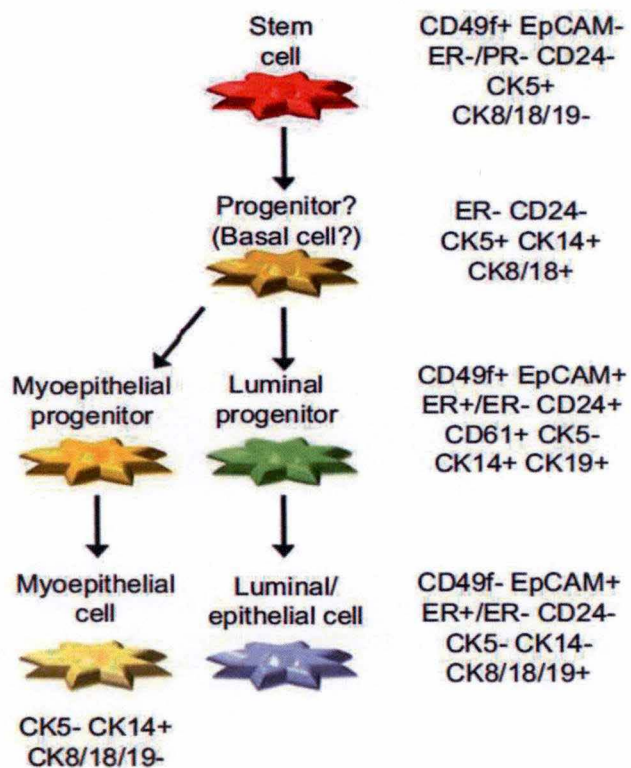


Figure 7 Les différents stades de différenciation d'une cellule souche mammaire. La différenciation est associée à l'expression de différentes protéines marqueurs qui peuvent être utilisés pour distinguer les types cellulaires au sein de la glande. La liste présentée ci-dessus n'est évidemment pas exhaustive. CD24 = heat stable antigen CD24, CD49f = integrin subunit $\alpha 6$, CD61 = Integrin beta-3, CK= cytokératine, EpCAM = Epithelial cell adhesion molecule, ER = Estrogen receptor- α , PR = Progesterone receptor, (Mollenhauer et al., 2012)

des rechutes après éradication de la masse tumorale. Pour pouvoir cibler ces cellules, il faut d'abord les identifier et savoir les distinguer des cellules souches normales, c'est ce qui est abordé dans la section suivante.

3. Cellules souches

A. Cellules souches normales

Comme expliqué au cours de la section 1, la glande mammaire est soumise à de grands changements architecturaux au cours de la vie d'une femme. En effet, on passe de simples tubules à un réseau dense et complexe de tubules et d'unités tubulo-sécrétoires en période de lactation. La fin de la lactation est suivie de la disparition de ces structures car les cellules les constituants meurent par apoptose ^{3,5}. À la grossesse suivante le cycle de croissance de la glande redémarrera et reformera les structures complexes ². Pour répondre à ces larges changements de contenu cellulaire, une population de cellules souches doit donc exister au sein du tissu mammaire. Dans les années 50, l'équipe de DeOme ⁴⁶ est la première à avoir pu montrer l'existence d'un tel type cellulaire au sein de la glande. Dans leurs expérimentations, des petits morceaux de l'épithélium d'une glande mammaire normale ou hyperplasique transplantés dans des fat pads dé-épithélialisés de souris avaient la capacité de régénérer des excroissances similaires au tissu originel. Les fat pads sont les structures accueillant les cellules de la glande mammaire et guidant la croissance de celle-ci. Le fait que ces excroissances reconstituées au sein des fat pads avaient également la capacité de former des excroissances secondaires une fois transplantées à nouveau constitua une preuve irréfutable de l'existence de cellules souches dans le tissu mammaire ⁴⁶. Les conclusions de l'étude de DeOme ont ensuite été confirmées par de nombreuses publications. En effet, des cellules souches ont par la suite été identifiées chez la souris mais aussi chez l'humain à l'aide de différentes protéines marqueurs comme, par exemple, CD29^{hi} (Integrin beta-1), CD24⁺ ou Sca-1 (Stem Cell Antigen-1) ⁴⁷⁻⁴⁹. On en connaît aujourd'hui plus sur les marqueurs exprimés par les cellules souche ou progénitrice de la glande mammaire (Fig. 7) ⁵⁰.

Au sein de la structure mammaire décrite dans la première partie, ces cellules souches sont retrouvées de manière prédominante à l'extrémité des bourgeons alvéolaires. Cette région, la plus sollicitée en cas de croissance glandulaire, est composée d'une couche interne de cellules hautement prolifératives ainsi qu'une couche plus externe de cellules indifférenciées ou cellules souches, appelées *cap-cells* ². En tant que cellules souches, ces cellules possèdent des capacités d'autoréplication et de différenciation. Une cellule souche, par une division asymétrique, donnera naissance à une cellule identique à elle-même et une cellule fille pouvant se différencier après un processus requérant plusieurs étapes de différenciation cellulaire. Il est important pour la suite de noter que la progéniture d'une cellule souche n'est pas limitée à une cellule différenciée ou une autre cellule multipotente : sur le chemin de la différenciation, une cellule souche peut devenir une cellule progénitrice, déjà engagée sur une voie définie, la menant à un destin plus restreint que dans le cas d'une cellule multipotente. Ces progéniteurs sont donc à mi-chemin entre la cellule souche multipotente et la cellule différenciée et possède donc des caractéristiques propres à chacun des deux types ⁵¹.

L'activité des cellules souches est finement régulée par des signaux provenant du microenvironnement (ou niche) ou bien provenant de cellules spécifiques adjacentes comme des cellules endothéliales ou des fibroblastes ⁵². Les voies de signalisations associées à ces signaux modulent l'activité de ces cellules et influencent l'équilibre entre autoréplication, différenciation ou la quiescence ⁵³. La capacité des cellules souches à régénérer un tissu est

maintenue par différentes voies de signalisation développementales telles que, entre autres, Notch, Wnt/ β -Caténine et Hedgehog⁵⁰. Parmi ceux-ci, la β -caténine joue parfois le rôle de marqueur pronostique dans le BC⁵⁴. Cette protéine fait partie intégrante de la voie de signalisation Wnt et joue le rôle de coactivateur transcriptionnel une fois transloquée dans le noyau. Une fois la voie de Wnt activée, la GSK3 (Glycogène synthase kinase 3) cessera de phosphoryler la β -caténine, qui ne sera alors plus adressée au protéasome. Une fois transloquée, cette protéine régule l'expression de la cycline D1, de MMP-7 (matrix metalloproteinase-7) ou encore de VEGF (Vascular endothelial growth factor)⁵⁴⁻⁵⁶. Il est évident que les cellules souches possèdent une signature d'expression génique caractéristique, où des facteurs de transcription et autres voies de signalisation développementales, marqueurs de cellules souches, sont exprimés. Citons entre autres Oct-3/4 (octamer-binding transcription factor 4), Sox2 (SRY (Sex determining region Y)-box2) ou Nanog (Homeobox protein NANOG), trois facteurs de transcriptions régulant l'auto-renouvellement des cellules non différenciées⁵⁷. Il est d'ailleurs possible d'induire la dédifférenciation de cellules différenciées par l'expression de certains facteurs clés (Oct-4, Nanog, Sox2, KLF4 ou c-Myc) et donc former ce qu'on appelle des induced pluripotent stem cells (iPSC)⁵³. Certains de ces facteurs sont d'ailleurs associés au cancer du sein, c'est le cas notamment de Sox2, dont l'expression est surtout reliée aux stades les plus précoces de BC⁵⁸. Ce facteur de transcription, en plus de promouvoir le caractère souche des cellules, peut également doter les cellules de capacités de survie aux signaux apoptotiques, induit la prolifération cellulaire mais dote également la cellule de capacités d'invasion⁵⁹.

B. Cancer stem cells (CSCs)

a. Généralités

Les cellules souches étant caractérisées par une capacité de prolifération importante, il est statistiquement plus probable que des mutations apparaissent et s'accumulent au sein de cette population plutôt que dans une cellule différenciée. L'acquisition de multiples mutations affecte, *in fine*, l'équilibre existant entre auto-renouvellement, quiescence et différenciation et conduisent à la formation de cellules souches cancéreuses (CSCs) ou cellules initiatrices de tumeurs (TICs). Ces cellules joueraient donc un rôle essentiel dans l'initiation de la formation d'une masse tumorale par un nombre de divisions accru et un dérèglement dans la faculté de différenciation entraînerait l'hétérogénéité intratumorale observée au sein de la tumeur⁶⁰.

b. Historique

Le concept de CSCs est né au milieu du 20^e siècle et n'a cessé d'évoluer depuis grâce à l'amélioration de la compréhension des mécanismes moléculaires et voies de signalisation impliqués dans la régulation de l'activité des cellules souches normales et surtout des techniques de purification (voir⁶¹ pour une revue complète de l'évolution du concept). C'est seulement dans les années 1970 que pour la première fois un cancer était lié à un pool de cellules souches cancéreuses⁶². L'équipe de Clarkson et *al.* a en effet mis en évidence que des cellules leucémiques pouvaient provenir de cellules souches⁶². Le concept a alors été étendu aux tumeurs d'une vaste gamme d'organes comme le cerveau, la vessie ou le sein⁶³⁻⁶⁵. C'est en 2003 que l'équipe d'Al-Hajj⁶⁵ a pu pour la première fois mettre en évidence une sous-population de cellules cancéreuses de type souche (breast cancer stem cells, BCSCs) à l'aide de marqueurs de surface tels que les clusters de différenciation CD44 (la principal

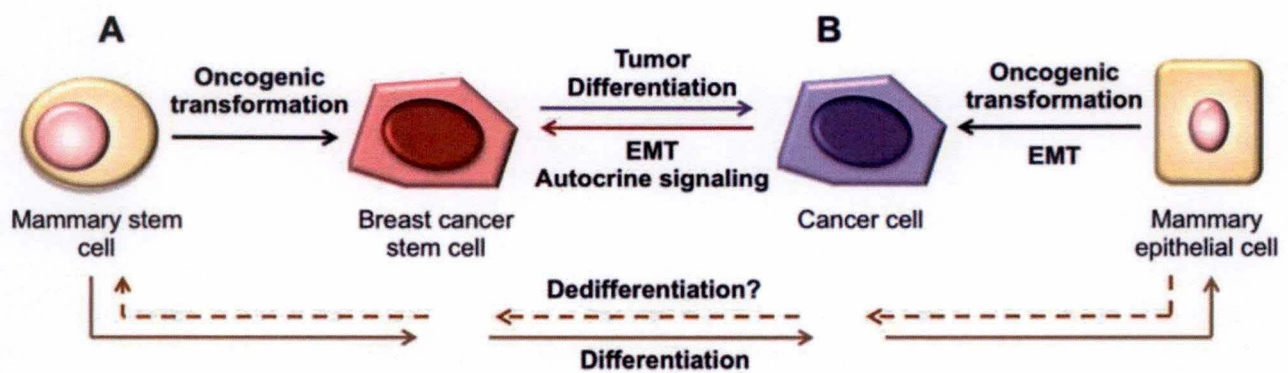


Figure 8 Représentation schématique des deux hypothèses majeures de l'origine des CSCs. (A) La formation des CSCs (cancer stem cells) pourrait résulter de mutations apparues au sein d'une cellule souche normale. (B) il a également été suggéré que les cellules cancéreuses différenciées pourraient se dédifférencier via un processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) en CSCs. (Velasco-Velázquez, Homsí, De La Fuente, & Pestell, 2012)

récepteur au Hyaluronan ⁶⁶), CD24 (impliqué dans l'adhésion cellule-cellule ou cellule-matrice ⁶⁷) ou CD326 (une molécule d'adhésion intercellulaire ⁶⁸) parfois aussi appelé Epithelial surface antigen (ESA) ⁶⁵. Dans ses expériences, il montrait que moins de 200 cellules CD44⁺/ESA⁺/CD24^{-low} étaient capables de récapituler l'hétérogénéité tumorale d'origine quand elles étaient implantées au sein d'une souris immunodéficiente NOD/SCID, alors que plus de 20 000 cellules cancéreuses ne portant pas ce phénotype ne le pouvaient pas ⁶⁵.

c. Origine et fonction des CSCs

L'origine des CSCs n'est pas encore bien définie mais il existe cependant au moins deux théories (Fig. 8). La première suggère que les CSCs seraient issues de cellules souches normales dont l'activité serait dérégulée. Cette hypothèse est notamment soutenue par de nombreuses données de la littérature montrant l'existence de similarités entre les CSCs et les cellules souches normales au niveau de leurs capacités répliquatives ou de différenciation ^{69,70}. La deuxième hypothèse implique une plasticité entre la population de CSCs et la population de cellules cancéreuses différenciées. Le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) a par exemple été décrit comme jouant un rôle essentiel dans la dédifférenciation des cellules cancéreuses ^{11,69}. Ce processus modifie les cellules de telle sorte qu'elles acquièrent des compétences de mobilité mais va aussi, et surtout, les doter de caractéristiques de cellules souches. De manière générale, l'EMT peut être induite par diverses voies de signalisation telles que Wnt (wingless integration site), Notch, EGF, celle des HIFs (hypoxia-inducible factor) ou encore la voie de l'inflammation, via le TGFβ (transforming growth factor β) ou NF-κB (nuclear factor- kappa B) ⁷¹. On parle de plasticité entre une cellule cancéreuse et une CSC car il existe une réversibilité dans le passage entre les deux états. Par exemple, de l'interleukine-6 (IL-6) modifie une cellule mammaire cancéreuse non-souche en une cellule de type BCSC ⁷² alors que la voie de l'acide rétinoïque, impliquant l'enzyme ALDH1, influence clairement la différenciation des CSCs ⁷³.

Outre les capacités d'auto-renouvellement et de différenciation que possèdent les CSCs, une de leur particularité est la résistance aux thérapies, principalement à la chimio- et radiothérapie. En effet, des études *in-vitro* et *in-vivo* ont montré qu'un traitement anti-tumoral enrichit la fraction en CSC de la masse tumorale ^{74,75}. Plusieurs mécanismes favorisant la résistance des cellules aux thérapies ont déjà été décrits dans la littérature. Signalons, par exemple, que les CSCs, surexpriment différentes protéines transmembranaires extrudant activement les drogues comme différents membres de la famille des ABC transporteurs (ATP-binding cassette). C'est une famille relativement large comptant 49 protéines dont au moins 3 sont associées au phénomène d'efflux des majeures molécules chimio thérapeutiques (taxanes, antimétabolites, inhibiteurs de tyrosine kinases): ABCB1 (P-glycoprotein), ABCC1 (multidrug resistance protein 1, MRP1) et ABCG2 (Breast cancer resistance protein, BCRP) ⁷⁶. Grâce à ces transporteurs, la concentration intracellulaire des molécules chimio thérapeutiques utilisées ne dépasse pas le seuil de toxicité pour les cellules. De plus les CSCs expriment fortement différentes protéines impliquées dans neutralisation des radicaux libres formés par les radiations thérapeutiques. Parmi ces dernières, des enzymes de la famille des ALDH (Aldéhyde déshydrogénase) comme ALDH1 et ALDH3A1 ont été décrites comme jouant un rôle essentiel dans la régulation de l'activité des CSCs. L'ALDH1 est connue comme étant surexprimée dans les CSCs, leurs progéniteurs ou les cellules hématopoïétiques ⁷⁷. Cette enzyme, oxydant le rétinol en acide rétinoïque, intervient dans les processus très précoces de différenciation cellulaire. Par la production intense de NAD(P)H (Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate)), capable de neutraliser les radicaux libres

et grâce à ses propriétés anti-oxydantes, les enzymes de la famille des ALDH influencent donc positivement la résistance aux traitements anti-cancéreux ^{76,78}. Enfin, les CSC peuvent résister aux dommages à l'ADN induits par les traitements (Cisplatine, methotrexate, doxorubicine) par une sur activation des mécanismes de réparation des cassures d'ADN simple ou double brin. On note une surexpression de gènes associés à la réparation de l'ADN, tels que *Nek1* (NIMA-related kinase 1), *Chek1* (Checkpoint kinase 1) ou encore *Hus1* (Checkpoint protein HUS1) ⁷⁹.

d. Isolation et purification des CSCs

Étant donné le rôle que jouent les CSCs au sein de la tumeur, et plus particulièrement au niveau de la résistance aux traitements et au niveau de la récurrence, il est d'un grand intérêt de pouvoir les identifier et les isoler. Il existe plusieurs approches permettant leur isolation, techniques reposant sur des propriétés différentes des CSCs.

Une technique couramment utilisée pour l'isolation des CSCs est celle de la « Side population » et repose sur la capacité des cellules souches à exclure des colorants du cytoplasme. En effet, qu'elles soient cancéreuses ou non, les cellules souches expriment des pompes à efflux expulsant les colorants à l'extérieur des cellules. La principale famille de transporteurs associée à cet effet est celle des transporteurs ABC (ATP-binding cassette) dont ABCG2 a la capacité d'éjecter les colorants Hoechst 33342 et Rhodamine 123 du cytoplasme des cellules. Cette capacité permet de discriminer les cellules souches des cellules différenciées. L'analyse par cytométrie de flux, permet alors de distinguer une population annexe (« side population », SP) ne contenant pas de colorant ^{80,81}. La preuve supplémentaire que ces cellules sont bien des cellules souches provient d'expériences de xénotransplantation chez la souris et dans le cas de cette technique les cellules SP sont bien capables de reformer une glande complète ⁴⁹. La limite de la méthode repose sur le fait que les colorants utilisés (principalement l'Hoechst, et la Rhodamine) sont des composés toxiques pour les cellules ne l'expulsant pas et biaisant les résultats ⁸².

Comme expliqué précédemment, certains membres de la famille ALDH (ALDH1 ou ALDH3A1) sont surexprimés dans les CSCs de différents types de cancers. L'analyse de leur activité peut dès lors être utilisée pour observer la présence de CSCs dans une population. La détection de la surexpression des enzymes, principalement ALDH1, western-blot, en RT-qPCR ou par spectrophotométrie ⁸³, peut révéler un enrichissement en CSCs. Des kits commerciaux ont également été développés comme par exemple l'Aldefluor assay (Stem cell technologies) et qui permettent de isoler ce type de cellules. Le principe de la réaction se base sur l'activité enzymatique de l'ALDH1 qui transforme un composé fluorescent non toxique, le BAAA (BODIPY®-aminoacetaldehyde), en un composé chargé, le BAA (BODIPY®-aminoacetate) possédant un fluorophore, le Bodipy. Le BAA est, à cause de sa charge négative, retenu dans les cellules. Les CSCs possédant donc une haute activité d'ALDH1 apparaîtront alors hautement fluorescente lors de l'analyse en cytométrie de flux ⁸³. Il a été montré que des cellules isolées par ce kit étaient capables d'auto-renouvellement et de différenciation mais surtout avaient la capacité de reformer des tumeurs in-vivo ⁸⁴.

Les marqueurs de surface sont fréquemment utilisés dans l'identification des populations souches bien qu'il n'existe pas de marqueur universel. CD44 et CD24, en combinaison avec l'absence de marqueurs de lignées matures (Lin ; CD2 (Lymphocytes T et Natural Killers), CD3 (lymphocytes T), CD10 (cellules hématopoïétiques), CD16 (macrophages, monocytes, neutrophiles), CD18 (leucocytes), CD31 (cellules endothéliales, plaquettes, macrophages), CD64 (macrophages, monocytes) et CD140b (cellules mésenchymateuses)), permet,

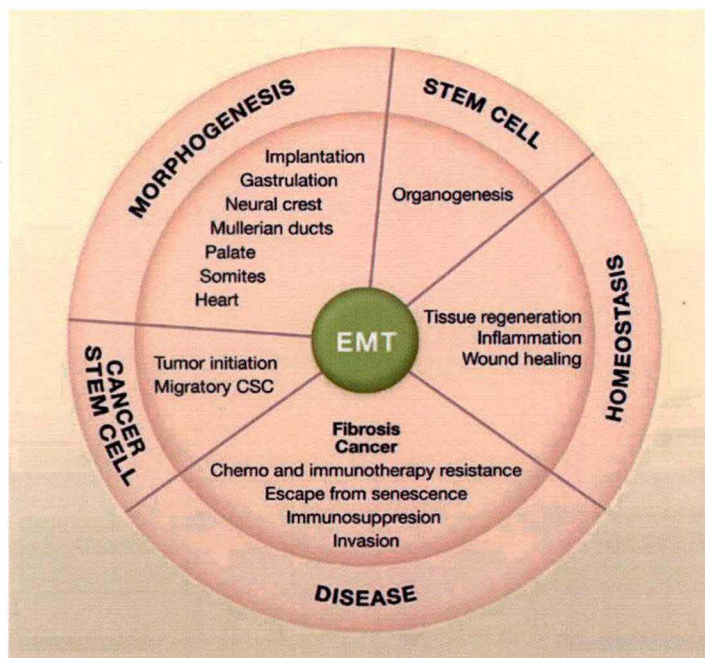


Figure 9 Implication de l'EMT dans de nombreux processus physiologiques ou pathologiques. L'EMT joue déjà un rôle prépondérant dans la formation et le développement des tissus embryonnaires primitifs. Plus tard, l'EMT participe à la formation des organes, à la réaction inflammatoire et à la réparation tissulaire. Le processus n'est pas toujours bénéfique étant donné le rôle que l'EMT peut avoir dans l'initiation des tumeurs (via les CSCs) ou la résistance du cancer aux traitements. (Thiery, Acloque, Huang, & Nieto, 2009)

tout comme dans les expériences de Al-Hajj, d'identifier une population capable de récapituler une tumeur dans une souris immunodéficiente. Différentes études utilisent d'autres combinaisons de marqueurs dans l'isolation de CSC dans les tumeurs mammaires, notamment le récepteur d'adhésion cellulaire ITGA6 (l'intégrine- $\alpha 6$ ou CD49f)⁸⁵ ou encore le cluster de différenciation CD133 (prominine ou PROM1, un possible organisateur de la topologie membranaire)⁸⁶. Il faut cependant garder à l'esprit qu'aucun marqueur universel de CSCs n'a jusqu'à présent été découvert⁸⁷. Cependant, il est tout de même possible de combiner les méthodes de détection pour affiner l'isolation des CSCs. Ainsi, dans les lignées MDA-MB-435, -231 et -468 la population ALDH+ peut montrer une capacité de tumorigénèse et de métastatisation plus importante si elle possède également les marqueurs décrits par Al-Hajj dans ses expériences (CD44⁺ et CD24⁻)⁸⁸.

Enfin, une autre technique couramment utilisée pour isoler les CSCs est celle de la formation de sphères. Cette dernière repose sur la capacité des cellules souches et progénitrices à résister à l'anoikis lorsqu'elles sont placées en culture non-adhérente. Dans le cadre de ce mémoire, c'est la technique qui sera principalement utilisée pour l'isolation des CSCs. La technique a été développée pour isoler des cellules souches neurales (NSC), ce qui forme alors ce qu'on appelle des neurosphères⁸⁹ mais a très vite été élargie à d'autres cancers, notamment le cancer du sein, pour former des mammosphères (MS)⁹⁰. En effet, parmi la population de cellulesensemencées, seules les CSCs et les progéniteurs pourront survivre. Les divisions successives de ces cellules donnent alors lieu à la formation de structures sphériques contenant donc une cellule souche et sa progéniture, essentiellement des cellules différenciées. Cette méthode permet de mesurer l'activité des cellules souches et progéniteurs de tissus normaux ou cancéreux^{90,91}. Les sphères formées lors de la première mise en culture, alors appelées sphères primaires, peuvent être réensemencées les mêmes conditions de façon sériée pour former des sphères secondaires, tertiaires et ainsi de suite. Une comparaison du nombre de mammosphères formées entre les passages peut alors nous aider à jauger l'activité d'auto-renouvellement des cellules souches⁹⁰. Bien que la technique permette l'isolation de CSCs et de progéniteurs, elle se base sur un phénomène artificiel et est donc moins physiologique⁹². De plus il existe de nombreuses différences entre les sphères formées à partir des différentes lignées cellulaires mammaires. Certaines lignées ne peuvent même pas former de telles structures^{90,93}.

e. CSCs et transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)

En conditions normales, l'EMT est une voie principalement impliquée dans l'embryogenèse. Lorsque cette voie est activée dans une cellule elle acquiert des capacités de migration et de motilité (Fig. 9)⁷¹. Comme expliqué au point c, l'EMT peut être responsable de l'inter conversion entre une cellule différenciée et une CSC⁶⁹. De plus, grâce aux propriétés nouvellement acquises par ce processus, les CSCs sont capables d'invasion des tissus environnants, voire même de l'invasion de tissus distants, par la métastatisation. La caractéristique de cette voie est l'activation de facteurs de transcription comme Snail ou Twist, eux-mêmes régulant la perte de marqueurs endothéliaux comme l'E-cadhérine et l'up régulation de la vimentine (une protéine de filaments intermédiaires)^{11,71,94}. La surexpression de la vimentine a notamment été décrite comme étant associée à un phénotype de cancer du sein très agressif, étant donné le caractère métastatique que possèdent alors les cellules cancéreuses⁹⁵. L'acquisition de l'EMT par une tumeur est dépendante du micro-environnement, notamment des cellules associées à la tumeur et formant l'hétérogénéité de celle-ci (cellules immunitaires, fibroblastes,...) et sécrétant des facteurs influençant l'initiation de la

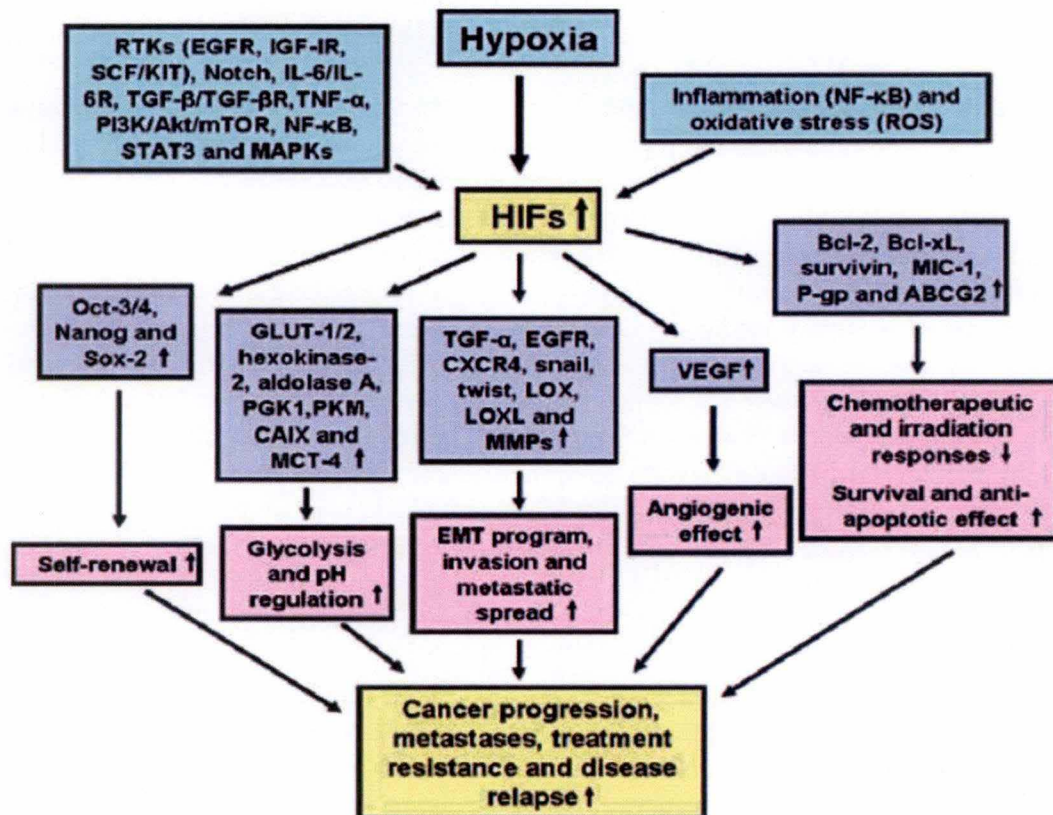


Figure 10 Principales voies d'activation des facteurs HIFs. Il est important de noter que l'hypoxie n'est pas le seul facteur influençant la stabilité des sous-unités HIF- α , les récepteurs à tyrosine kinase tels que ceux des facteurs de croissance IGF-1R ou IGF-1R, Notch, l'IL-6 et le médiateur principal de l'inflammation, NF- κ B vont eux aussi assurer la stabilité des HIF- α . Les gènes cibles des HIFs sont impliqués dans de très nombreux processus cellulaires promouvant la progression cancéreuse via des gènes augmentant le taux de glycolyse (Glut-1 ou l'hexokinase-2) ou d'autres favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (VEGF), la métastatisation (via l'EMT, avec Snail ou Twist, ou des facteurs de croissance, comme l'EGFR) et la résistance au traitement (grâce à l'expression de gènes anti-apoptotiques, comme par exemple la survivine ou Bcl-2). Bcl-2 = B-Cell lymphoma-2, EGFR = Epidermal growth factor receptor, EMT = Epithelial-mesenchymal transition, Glut-1 = Glucose transporter 1, HIF = Hypoxia inducible factor, IGF-1R = Insulin-like growth factor receptor, IL-6 = Interleukine-6, NF- κ B = Nuclear factor- κ B, VEGF = Vascular endothelial growth factor, (Mimeault & Batra, 2013)

transition ⁷¹. Il est intéressant de noter que les facteurs impliqués dans la maintenance et l'expansion de la population de CSCs (Wnt, Notch, Hedgehog,...) sont également impliqués dans l'EMT et le processus de métastatisation. En plus de l'EMT, une tumeur est souvent caractérisée par des zones hypoxiques et c'est ce dernier point que nous allons développer dans la section suivante.

4. Hypoxie

A. Généralités

Au cours de la croissance rapide d'une tumeur la vitesse d'expansion tumorale surpasse bien souvent celle de son réseau vasculaire amenant l'oxygène (O₂) et les nutriments. De plus, les vaisseaux créés au sein de ces tumeurs sont généralement anarchiques, menant à une circulation perturbée réduisant donc l'apport en O₂ ⁹⁶. Il est donc fréquent d'observer des zones hypoxiques au sein même d'une tumeur. Une zone hypoxique est considérée comme telle quand la pression partielle en oxygène ne dépasse pas 2,5 mm Hg et est observée en moyenne à partir d'une distance de 70 µm du vaisseau le plus proche ⁹⁷. Depuis longtemps, on imaginait la concentration en oxygène atmosphérique comme étant la concentration physiologique. Les progrès de ces dernières décennies ont montré qu'il s'agissait d'une conception fautive, la concentration physiologique d'oxygène se situant entre 2 et 9% d'O₂ (14 à 65 mm Hg), avec évidemment des différences entre les organes ⁹⁸.

B. Facteurs d'activation génique

La régulation de la réponse cellulaire à ces concentrations en oxygène variantes s'effectue grâce à l'action de facteurs de transcription de la famille des HIFs (hypoxia inducible factors). Pour agir sur la transcription de gènes, ces facteurs de transcription doivent former un hétérodimère en associant une sous-unité HIF-β (appelée aussi Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT) constitutivement active, et une HIF-α régulée sous dépendance de l'oxygène. L'hétérodimère formé sera alors un facteur de transcription de type « basic helix loop helix » (bHLH), reconnaissant des motifs RCGTG, appelés hypoxia responsive elements (HREs) dans la région promotrice des gènes cibles. Bien que l'hypoxie initie la mort cellulaire par apoptose pour la plupart des cellules ⁹⁹⁻¹⁰¹ elle joue un rôle important dans la régulation de l'activité des cellules souches ⁵⁷. L'activation de la voie des HIFs ne se fait pas uniquement grâce à la diminution de pression partielle en oxygène mais également via l'action de stress oxydatifs ou de différentes voies de signalisation initiées par des facteurs de croissance et de cytokines. Comme indiqué à la figure 10, les voies de l'EGFR, l'IGF-1R (insulin-like growth factor-1 receptor) ou des MAP kinases pour ne citer qu'eux, collaborent pour augmenter l'expression et/ou la stabilité du facteur HIFα ¹⁰²⁻¹⁰⁴.

Parmi les gènes décrits comme étant des cibles des facteurs de transcription HIF se trouvent, par exemple, de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme énergétique tels que GLUT1 (glucose transporter 1, facilitant l'entrée de glucose dans la cellule) ou la GAPDH (Glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, oxydant le glyceraldéhyde-3-phosphate en 1,3-diphosphoglycérate lors de la glycolyse) ou la néovascularisation (comme (EG)-VEGF, (Endocrine gland-derived) vascular endothelial growth factor, régulant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins). Les HIFs ciblent également des gènes relatifs à la survie comme l'EPO (Erythropoïétine, l'hormone entraînant la maturation des globules rouges), le VEGF ou l'IGF2 (insulin-like growth factor-2) ou la migration cellulaire (comme c-Met, un

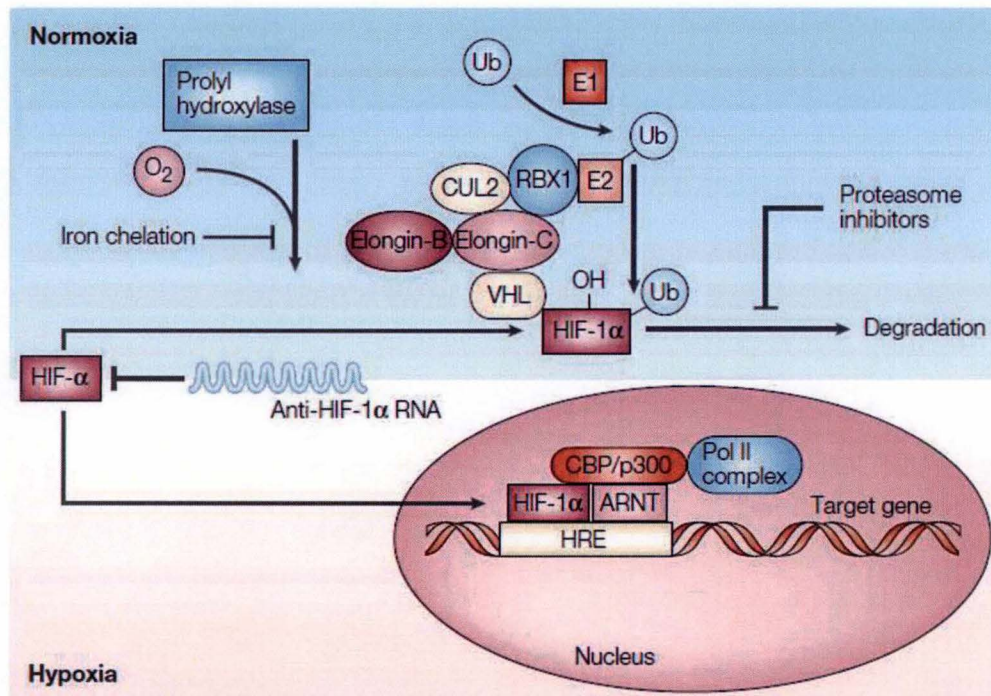


Figure 11 Mécanisme d'action du facteur de transcription HIF : La réponse aux différentes concentrations en oxygène se fait par le biais d'enzymes à domaine prolyl hydroxylase (PHD). En conditions normoxiques, un PHD ajoute rapidement des groupements hydroxyles sur les résidus 402 et 564 d'HIF- α . Ce motif de groupements hydroxyles est alors reconnu par la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), qui fait partie d'un complexe E3 d'une ubiquitine ligase. La reconnaissance d'HIF- α hydroxylé par la pVHL est suivie de l'ajout d'une série de groupements ubiquitine qui a pour conséquence de diriger la protéine vers le complexe de dégradation protéasomiale 26S. La stabilité d'HIF- α ne sera assurée qu'à partir d'une concentration en oxygène inférieure à 5%, suite à l'inactivation de la PDH (Pouyssegur, Dayan, & Mazure, 2006). Il existe 3 isoformes de la sous-unité α , nommées HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α , la dernière étant moins décrite et son rôle peu mis en évidence. Si la concentration en oxygène passe sous la barre des 5%, le mécanisme de dégradation des HIF- α cessera de fonctionner. La sous-unité peut alors transloquer vers le noyau et, avec la sous-unité β (ou ARNT) former un facteur de transcription. Ce dimère HIF- α -ARNT est reconnu par l'adaptateur CBP/P300, le complexe pouvant alors recruter le complexe de transcription. CBP = CREB-binding protein, P300 = E1A (Adenovirus early region 1A) binding protein p300. (Harris, 2002)

récepteur membranaire activant la voie des MAP kinases)¹⁰⁵. En plus de la régulation de ces gènes, et de manière intéressante, il existe une activation de l'expression de gènes associés à la régulation de la pluripotence (Oct-3/4, Sox2, Nanog) qui a entre autre été démontrée dans des lignées cellulaires de cancer de la prostate (PCU-3) et à des concentrations en oxygène allant de 7 à 1% d'O₂⁵⁷. Cet effet sur la pluripotence des cellules aura des répercussions sur le tissu atteint, et notamment sur la population de CSCs intratumorale par exemple.

C. Isoformes d'HIF- α

Il existe plusieurs isoformes de la sous-unité HIF- α médiant la réponse transcriptionnelle O₂ dépendante. C'est en 1992 que la première a été identifiée, maintenant appelée HIF-1 α , avec une expression dans presque tous les types cellulaires. Deux ans plus tard HIF-2 α a été découverte (appelée alors endothelial PAS protein 1, EPAS1). Cette sous-unité a cependant une activité plus restreinte mais on l'observe quand même largement co-exprimée avec HIF-1 α dans de nombreux types cellulaires (rein, poumon, hépatocytes, macrophages, astrocytes,...⁹⁹). Ces deux isoformes sont responsables de la majorité des effets HIF-dépendants mais il existe tout de même une dernière isoforme, HIF-3 α . Cette dernière joue également un rôle dans la réponse hypoxique, car en elle est capable de former des dimères avec les deux autres sous-unités, initiant la transcription de gènes possédant un HRE dans leur promoteur, mais de façon plus faible que ne le feraient HIF-1 α ou -2 α ^{100,101}. HIF-1 α ou HIF-2 α partagent un grand nombre de gènes cibles comme la voie du VEGF ou de l'EPO. Il semblerait cependant que HIF-1 α soit la seule isoforme à activer la transcription de gènes glycolytiques comme la *Pgk1* (phosphoglycerate kinase 1) ou *Alda* (aldolase A)¹⁰⁶. De manière intéressante, HIF-2 α a récemment été décrit dans la régulation hypoxique de l'expression du facteur de transcription de cellules souches Oct-4 ou de DLL4 (delta-like ligand 4), qui est impliqué dans la voie de signalisation Notch^{107,108}. Ces cibles différentes sont le fait de l'interaction des sous-unités α avec des cofacteurs transcriptionnels spécifiques à l'isoforme, étant donné qu'aucune séquence de reconnaissance autre que le motif RCGTG n'a été découvert pour les HIFs de manière générale¹⁰⁹.

Même si le processus de stabilisation, et donc d'activation, des isoformes α et β se déroule de manière identique (Fig. 11), il apparaît que chacune s'accumule dans les cellules à des concentrations en oxygène différentes. En effet, HIF-2 α est stabilisé dans des cellules soumises à une pression en oxygène allant de 2 à 5% alors que la stabilisation d'HIF-1 α nécessite une concentration en oxygène plus basse (0 à 2% O₂)^{110,111}. De plus, le laps de temps durant lequel ces protéines restent activées n'est pas identique. Uchida et al.¹¹² ont montré que dans des cellules A549 (cellules épithéliales de poumon) soumises à une concentration en O₂ de 0,5% la stabilisation des deux protéines suivait des cinétiques différentes. En effet là où HIF-1 α est stabilisée rapidement après exposition à l'hypoxie et que sa concentration décroît après quelques heures, HIF-2 α est maintenu pendant une période allant jusqu'à 48h¹¹². L'effet d'une hypoxie modérée, et donc de l'activation d'HIF-2 α sur les cellules peut se prolonger bien après la ré-oxygénation des cellules comparé à une hypoxie sévère.

La voie de signalisation de l'hypoxie influence donc la transcription d'un grand nombre de gènes, avec pour réponse une adaptation à l'hypoxie (métabolisme du glucose, formation de néo-vaisseau,...) ou une régulation positive d'un caractère indifférencié (Oct-4 par exemple). En plus de ça, l'hypoxie a aussi été décrite comme régulant l'expression et l'activité de de notre récepteur d'intérêt, ER- α .

D. Effets de l'hypoxie sur ER- α

Il a été décrit que dans des cellules MCF-7 ou T47D, deux lignées ER-positives, l'hypoxie réprime l'expression du récepteur nucléaire ¹¹³. Premièrement, le facteur de transcription HIF-1 α /ARNT pourrait être capable de se lier à la région promotrice du gène *ESR1* (le gène codant pour ER- α) et par cette liaison induire une diminution de son taux de transcription. À ce jour, de plus amples études sont requises pour mettre à jour cette liaison, étant donné que pour l'instant on n'a pas pour mettre en évidence de site de liaison d'HIFs au sein du promoteur d'*ESR1*. Il se pourrait alors que ce soit plutôt un autre facteur de transcription qui agirait sur la transcription d'ER- α , celui-ci pouvant être activé par les HIFs ¹¹³. En outre, il a été possible de montrer que HIF-1 α interagit directement avec le récepteur nucléaire. La formation du complexe ER- α -HIF-1 α mène à la dégradation de celui-ci, via l'activation de la voie ubiquitine-protéasome ¹¹⁴. Insistons sur le fait que l'hypoxie n'est évidemment pas le seul régulateur de l'expression d'ER- α (Table 1).

Il a d'ailleurs été montré qu'au sein d'une tumeur mammaire, il existe une corrélation inverse entre l'expression d'HIF-1 α et d'ER- α , ceci pouvant indiquer effectivement qu'il existe un lien entre les deux ¹¹⁵. L'expression importante d'HIF-1 α au sein d'une tumeur est d'ailleurs synonyme d'un pronostic négatif pour le patient, étant donné que l'hypoxie est connue pour jouer un rôle majeur dans la résistance d'une tumeur aux divers traitements radio- ou chimio-thérapeutiques ^{116,117}.

5. Relations entre ER- α , CSCs et hypoxie

De manière intéressante, il a été montré qu'ER- α est un régulateur majeur du caractère « souche » des CSCs par différents mécanismes.

Premièrement, l'ER- α régule positivement l'expression du gène *OCT4*, gène qui, pour rappel, code pour un facteur de transcription impliqué dans les étapes précoces de l'embryogenèse ¹¹⁸. Il a en effet été montré qu'une concentration en E₂ de 10 nM permet d'induire significativement l'expression du gène dans des MS de MCF-7, incubées avec la molécule. Par ailleurs, les auteurs ont montré que cette augmentation d'expression du gène OCT4 dans les MS incubées en présence d'E₂ était associée à une augmentation de la SFE (sphere forming efficiency). Une immunoprécipitation de chromatine (ChIP) a permis de démontrer que cet effet de l'E₂ sur l'expression d'Oct-4 est obtenu par liaison d'ER- α dans le promoteur d'Oct-4, au niveau de deux séquences ERE ¹¹⁹.

ER- α a également été décrit comme régulant positivement l'expression du gène codant pour le facteur de transcription Sox2 dans des cellules adhérentes ER+ telles que les MCF-7 et les T47D. ER α augmenterait l'expression de SOX2 de manière indirecte. En effet, les auteurs ont montré qu'ER α activé (après 24 h d'incubation en présence de 10 nM d'E₂) réprimerait en effet l'expression du miRNA 140 (miR-140) lui-même connu comme inhibant ensuite la traduction de l'ARN messager de Sox2 et donc, par son action down régulatrice, l'ER- α favorise l'expression du facteur de transcription et aide à maintenir le caractère « souche » de la cellule 120. Par un traitement à l'E₂ et donc par la surexpression de Sox2 des cellules, les MCF-7 acquerraient une meilleure capacité à former des sphères, par une activité des CSCs augmentée.

Plus récemment encore, Sun et al. ¹²¹ ont montré que ER- α régule positivement l'expression du facteur de transcription Glil, un acteur majeur de la voie de signalisation du Sonic Hedgehog (Shh) une voie de signalisation décrite comme étant suractivée dans les CSCs de différents modèles expérimentaux (Gliomes ¹²², thyroïde ¹²³ ou prostate ¹²⁴) ¹²¹. En effet,

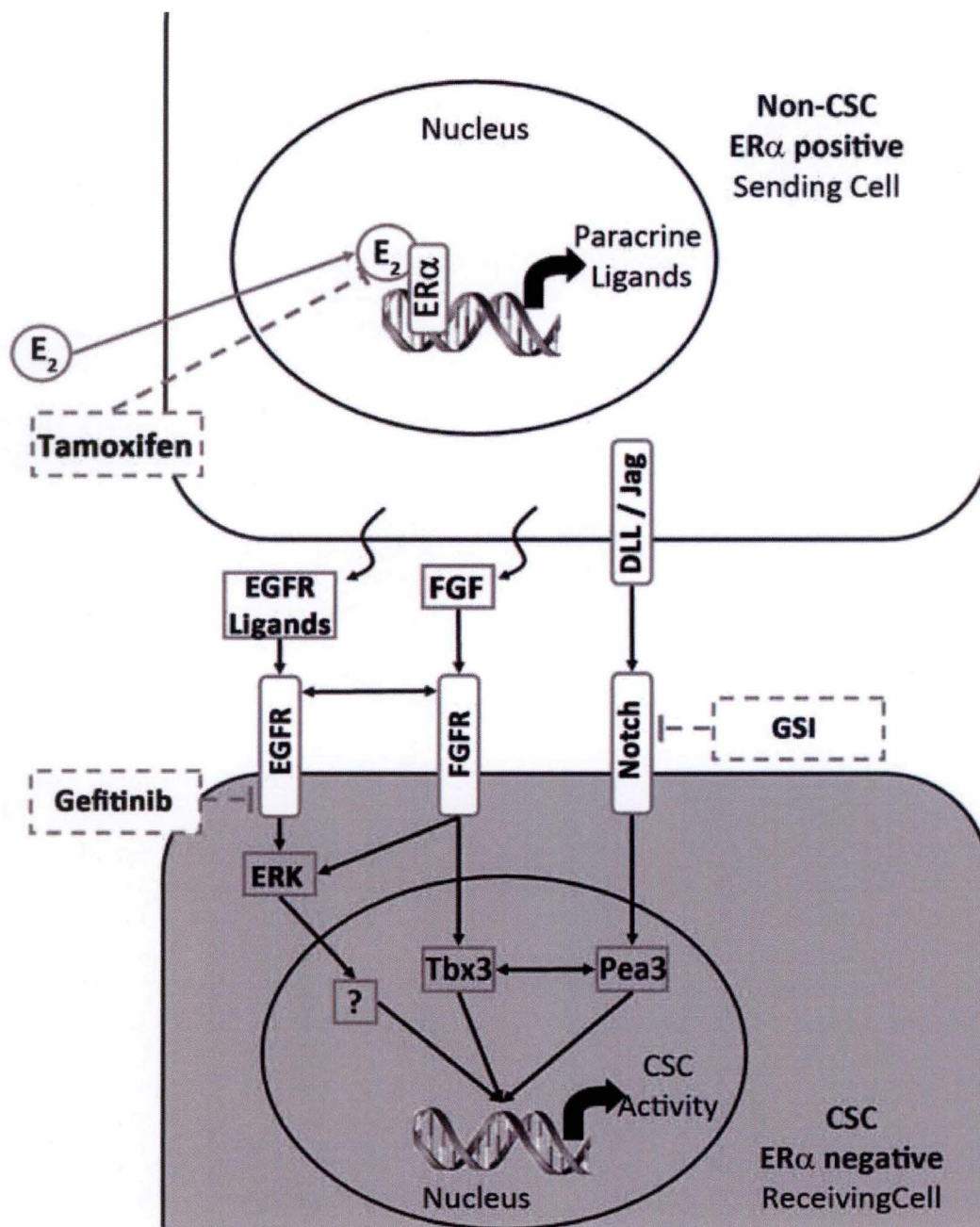


Figure 12 Mécanismes d'activation paracrine des CSCs par l'E₂. En dépit de l'absence d'expression d'ER-α au sein des CSCs, l'ER-α peut tout de même exercer un effet sur celles-ci. Dans des cellules cancéreuses voisines, l'E₂ peut, par l'activation d'ER-α, sécréter des facteurs paracrines dans l'environnement. Ces facteurs peuvent alors activer des voies de signalisation au sein des CSCs, aboutissant à l'activation de facteurs de transcription tels que Tbx3 (T-Box Transcription Factor TBX3) ou Pea3 (polyoma enhancer activator 3), eux-mêmes favorisant l'activité des CSCs. Les voies paracrines impliquées sont celles des récepteurs EGFR (epidermal growth factor receptor), FGFR (fibroblast growth factor receptor) et Notch, tous les trois activés par leurs ligands respectifs, l'amphireguline (AREG) pour l'EGFR, le FGF9 (fibroblast growth factor 9) pour le FGFR et le DLL/Jag ((Delta-like ligand et Jagged-1) pour Notch. Inhiber ces voies, par des inhibiteurs d'ER-α (Tamoxifen), d'EGFR (Gefitinib) ou de Notch (Gamma secretase inhibitor, GSI) permet de supprimer cet effet (Harrison et al., 2013).

il a pu être mis en évidence qu'un traitement de 10 nM d'E₂ augmentait significativement l'expression de Gli1 dans des cellules adhérentes exprimant ER-α (MCF-7 ou HCC1428), par liaison d'ER-α dans son promoteur et activant ainsi la voie de signalisation du Shh. De plus ils ont pu montrer qu'une exposition des MCF-7 ou HCC1428 de 10 jours avec 10 nM d'E₂ augmentait la proportion de cellules CD44⁺/CD24^{-low} mais aussi le nombre de MS formés après 7 jours. La perte de cet effet en cas d'inactivation de Gli1 par la technique du shRNA souligne le rôle important de Gli1. Toujours via l'activation de Gli1, ER-α était également capable d'activer l'EMT dans des cellules ER-positives, leurs donnant des capacités d'invasion et de migration ¹²¹.

La régulation de l'activité des CSCs passe également par des effets indirects consistant en une activation paracrine. Selon certains auteurs, les CSCs exprimeraient que peu ER-α ¹²⁵. Mais même sans l'expression du récepteur, la croissance des CSCs serait tout de même influencée par de l'E₂, par le biais de cellules cancéreuses non souches environnantes qui, elles, expriment le récepteur. Par exemple, dans ces cellules MCF-7 adhérentes exposées à 10 nM d'E₂, ER-α activé augmenterait l'expression du gène codant la protéine FGF9 (Fibroblast growth factor 9) dans les cellules cancéreuses différenciées. Ce facteur, sécrété dans le milieu, peut se lier au FGFR3 (Fibroblast growth factor receptor 3) fortement exprimé par les CSCs. La liaison de cette cytokine à son récepteur induirait, *in fine*, l'activation du facteur de transcription Tbx3 (T-Box Transcription Factor TBX3) et des voies signalisation de Wnt et du FGF, créant une boucle positive stimulant la prolifération des CSCs et leur capacité à former des sphères ¹²⁶. D'autres voies paracrines ont été rapportées comme influençant l'activité des CSCs. Selon l'équipe de Harrison les voies paracrines activées lors d'une stimulation à l'E₂ (48 h avec 1 nM d'E₂) sont, en plus de celle du FGF précédemment décrite, également celles de l'EGFR et de Notch. Ces trois voies agiraient de concert chez les CSCs et augmenteraient leur activité et leur prolifération ¹²⁷ (Fig. 12).

Soulignons tout de même qu'outre ces différentes études présentant ER-α comme régulateur positif de l'activité des CSCs, une publication récente suggère au contraire que ce facteur de transcription influence négativement l'activité des CSCs. Simões et al. ¹²⁸ ont montré que la SFE de la lignée MCF-7 était réduite de manière importante quand les sphères étaient incubées en présence de 10 nM d'E₂ pendant 7 jours. De manière intéressante, cette diminution de SFE était associée à une diminution de l'expression de Sox2, Nanog et Oct-4 dans les MS. La différence d'effet obtenu vient sans doute du modèle expérimental ¹²⁸. Là où un traitement des cellules adhérentes à l'E₂ augmentait la SFE des cellules ER+ ^{119,121,126}, l'ajout du ligand d'ER-α dans les conditions non-adhérentes diminuait au contraire la SFE de ces mêmes lignées cellulaires ¹²⁸.

Nous avons déjà présenté l'hypoxie comme médie l'activité des CSCs et ce, en influant sur l'expression de facteurs de transcription des cellules souches. Les facteurs de transcription participant à la maintenance et à l'activité d'auto-renouvellement des cellules souches tels qu'Oct4, Sox2 ou NANOG sont effectivement surexprimés lorsque la pression partielle en oxygène diminue et entre dans la zone considérée comme l'hypoxie sévère (environ 1% d'O₂). L'effet de l'hypoxie ne s'arrête pas là, la signature de miRNAs observée dans des cellules cancéreuses soumises à l'hypoxie était comparable à celle présente dans une lignée de cellules souches embryonnaires humaines (hESC). Qui plus est, les cellules ayant acquis cette signature génique de type hESC en hypoxie montrent une capacité accrue à la formation de sphères, indiquant que l'hypoxie, via la voie des HIFs initie une dédifférenciation des cellules vers un état de cellules souches. Cette augmentation d'activité des facteurs de transcription de cellules souches au sein des cellules cancéreuses leurs un avantage de survie et surtout un phénotype plus invasif et agressif ^{53,57}.

En plus de ça, une étude récente parvient à faire un lien entre l'hypoxie, les CSCs et l'ER- α , plus particulièrement dans le cadre du cancer du sein. Dans leur modèle expérimental ils ont incubé plusieurs lignées cellulaires mammaires en normoxie ou en hypoxie sévère (1% O₂) pendant deux jours. Ils ont ensuite ensemencé ces cellules en conditions non-adhérentes et ont analysé la SFE après 5 jours. De manière forte intéressante, l'activité des CSCs variait entre les lignées et en réponse à l'hypoxie. L'activité des CSCs était grandement augmentée pour des lignées cellulaires ER+ (MCF-7 ou T47D) pré-incubées en hypoxie alors qu'une diminution d'activité se marquait pour les lignées ER- (comme les MDA-MB-231). En allant plus loin, ils ont découvert que cette réponse à l'hypoxie dans les CSCs s'effectuait bien par HIF-1 α et ER- α car l'augmentation de SFE était perdue si les cellules étaient incubées en hypoxie (1% O₂) en présence d'un siRNA contre HIF-1 α , d'un inhibiteur d'HIF-1 α (le YC1) ou d'un inhibiteur d'ER- α (Tamoxifen). L'effet de l'hypoxie sur les CSCs passait également par l'activation des voies Notch1 et EGFR, l'inhibition de l'une ou de l'autre supprimant l'effet hypoxique observé ¹²⁹.

La plupart des études investiguant les effets de l'hypoxie sur les CSCs ou sur ER- α s'intéressent quasiment exclusivement à une hypoxie sévère de 1% d'O₂. Cependant, il est de plus en plus reconnu que cette concentration en oxygène ne reflète pas totalement la situation *in-vivo*. Bien que dans les tumeurs la concentration en oxygène descend fréquemment jusqu'à cette valeur, il est extrêmement fréquent également de trouver des zones avec des concentrations d'oxygène intermédiaires, de l'ordre de 2 à 5% d'O₂, sachant que la concentration physiologique en oxygène ne dépasse pas les 10% ^{98,130,131}. En conséquence, aujourd'hui de plus en plus d'études tendent à s'intéresser à l'impact d'une concentration en oxygène considérée comme étant une hypoxie modérée (5% O₂) ^{110,130}.

6. Objectifs du mémoire

Ce mémoire avait 2 objectifs :

Dans la première partie, nous avons voulu caractériser le modèle de sphères formées par la lignée MCF-7 incubée pendant 24 h en normoxie. En effet, il est connu que toutes les lignées cellulaires ne sont pas capables de former des sphères, et surtout, que la densité cellulaire de départ a un effet sur la SFE. Nous avons aussi voulu savoir quel était l'impact d'une hypoxie sévère ou modérée sur l'activité des CSCs, en mesurant la SFE. En effet, comme nous l'avons mentionné au cours de l'introduction on sait que l'hypoxie sévère régule l'activité des CSCs, elle altère positivement l'expression de gènes marqueurs de cellules souches (Sox2, Oct4, Nanog) via l'activation de HIF-1 α .

Au cours de la deuxième partie de notre travail, nous avons voulu analyser l'effet de l'hypoxie sur le récepteur ER- α d'un point de vue abondance du transcrit, de la protéine, mais aussi de son activité. En effet, ce récepteur nucléaire est aussi largement décrit dans la littérature comme lui aussi régulant positivement sur l'expression de certains de ces gènes marqueurs de cellules souches et surtout qu'il stimulerait le caractère souche des cellules cancéreuses. L'hypoxie et ER- α jouent donc un rôle important sur l'activité et la maintenance des CSCs. Dans les expériences reliant hypoxie, ER- α et CSCs, seule l'hypoxie sévère (1% O₂) a été testée alors qu'on sait qu'une concentration en oxygène plus physiologique (5% O₂) a également un impact positif sur la population de CSCs ¹¹⁸. Des résultats préliminaires générés au laboratoire suggérant que l'hypoxie modérée augmente l'abondance d'ER- α dans les MS de MCF-7, le but de cette étude était donc d'explorer et de tenter de comprendre l'effet d'ER- α sur la croissance des CSCs dans des conditions d'hypoxie sévère (1% O₂) et modérée

(5% O₂). Pour ça, nous avons modulé l'activité du récepteur à l'aide d'un activateur et d'un inhibiteur d'ER- α et nous avons mesuré l'expression de certains marqueurs de CSCs.

Au cours de notre travail nous avons utilisé une lignée de cellules ER-positive MCF-7 qui est classée comme étant de type luminal A. Pour pouvoir étudier les CSCs au sein de cette lignée, nous avons utilisé la technique des mammosphères. Comme décrit dans la section relative à l'isolation des CSCs (paragraphe 3.B.d), la technique consiste en la mise en culture de cellules en conditions non-adhérentes. De cette manière, la population de cellules souches ou progénitrice sera sélectionnée et pourra proliférer. Nous avons incubé ces sphères pendant 24 h en normoxie (21% d'O₂), en hypoxie modérée (5% d'O₂) ou sévère (1% d'O₂) et nous avons pu analyser d'expression et l'abondance protéique de gènes marqueurs. La mesure de l'activité des CSCs est également possible en mesurant la SFE selon les différentes conditions.

Tableau 2 Composition du DMEM (Dulbecco's modified eagle medium)

Composition	Concentration finale
DMEM (Lonza, Suisse)	
FBS inactivé (Lonza, Suisse)	10%
Hepes (Lonza, Suisse)	15 mM
Pénicilline/streptomycine (Pen/Strep, Lonza, Suisse)	10 000/10 000 U/ml

Tableau 3 Composition du PBS (Phosphate buffer saline)

Composition	Concentration finale
KH ₂ PO ₄ (Merck, USA)	1,54 mM
Na ₂ HPO ₄ (Merck, USA)	2,7 mM
NaCl (VWR International, USA)	154 mM ; pH 7,2

Tableau 4 Composition du DMEM sans rouge phénol

Composition	Concentration finale
DMEM sans rouge phénol	
FBS traité au charbon (Lonza, Suisse)	10%
Hepes (Lonza, Suisse)	15 mM
Pénicilline/streptomycine (Pen/Strep, Lonza, Suisse)	10 000/10 000 U/ml

Tableau 5 Composition du DMEM/F12

Composition	Concentration finale
DMEM/F12 (Life Technologies, USA)	
Glutamax (Stem Cell Technologies, Canada)	2 mM
Supplément B-27 (Gibco, USA)	1 %
Héparine (Stem Cell Technologies, Canada)	4 µg/ml
Hydrocortisone (Stem Cell Technologies, Canada)	0,5 µg/µl
Pénicilline/streptomycine (Pen/Strep, Lonza, Suisse)	10 000/10 000 U/ml
rEGF (Invitrogen, USA)	20 ng/ml
Insuline (Sigma, USA)	5 µg/ml

Matériel et méthodes

1. Culture cellulaire

Au cours de cette étude, nous avons utilisé la lignée cellulaire MCF-7 (# HTB-22, ATCC, USA) comme modèle expérimental. En effet, ces cellules expriment ER- α et sont couramment utilisées dans la littérature ^{90,132}. Les cultures parentales sont cultivées dans un incubateur (Binder, Allemagne) sous une atmosphère composée de 21% d'O₂ et de 5% de CO₂ et dans du milieu Dulbecco's Modified Eagle medium (DMEM, Table 2 ; Lonza, Suisse) supplémenté par 10 % de FBS inactivé (Lonza, Suisse), 15 mM d'Hepes (Lonza, Suisse) et 10 000/10 000 U/ml de pénicilline/streptomycine (Pen/Strep, Lonza, Suisse). On obtient l'inactivation du FBS en chauffant ce dernier pendant 30 min à 55°C. Une fois les cellules à confluence en monocouche dans une flasque de 25 cm² (Greiner Bio-one, Allemagne), elles sont rincées à l'aide de 5 ml de PBS (phosphate buffer saline, Table 3). Ensuite elles sont incubées en présence de 1 ml de trypsine-EDTA (Lonza, Suisse) pour dissocier le tapis cellulaire. Une fois les cellules dissociées, la trypsine est inactivée par l'ajout de 4 ml de milieu DMEM complet. La suspension cellulaire est alors centrifugée pendant 5 min à 200 g. 600 000 cellules sont ensuiteensemencées dans une nouvelle T25 et arrivent à confluence après 3 ou 4 jours. Les cellules sont maintenues en culture pendant 25 passages. Le rouge phénol contenu dans le DMEM étant connu comme pouvant activer ER- α dans des lignées ER-positives (comme les cellules MCF-7 ¹³³), les cellules ont été incubées pendant 3 jours dans du milieu DMEM sans rouge phénol supplémenté (Table 4) avec 10% de FBS traité au charbon, comme décrit par Green et Leake ¹³⁴ avec quelques modifications. Brièvement, une solution de 10 nM d'Hepes pH 7,4 contenant 0,25 M de Sucrose, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25%, de charbon 4C Norit A (Sigma, USA) et 0,0025% de dextran T-70 (Sigma, USA) est incubée pendant 16h à 4°C. Pour chaque millilitre de sérum à traiter, un volume équivalent de la suspension de charbon est récupéré par une centrifugation de 10 min à 500 g. Le surnageant est aspiré, remplacé par du FBS et incubé 16h à 4°C. Le charbon activé étant une protéine liant les stéroïdes, cette incubation permet de supprimer entre autre toute trace d'hormones pouvant interférer avec ER- α . Le charbon activé est séparé du sérum par une centrifugation de 500g pendant 2 h. Le sérum est finalement décomplémenté comme décrit précédemment et stérilisé par filtration au travers d'un filtre de 0,2 μ m (VWR International, USA).

2. Culture de mammosphères en conditions normoxique et hypoxiques

Pour permettre la formation de sphères, une suspension de cellules isolées par 30 passages allers-retours à la pipette de 1 ml estensemencée à une densité de 1000 cellules/cm² dans une boîte de Pétri de 78 cm² (Greiner Bio-One, Allemagne) préalablement coatée avec 10 ml de PBS-agarose 1% stérile. En effet, ce dernier prévient l'adhésion cellulaire. Les CSCs et progéniteurs résistent à la mort cellulaire par anoïkis dans ces conditions non-adhérentes et se divisent successivement pour former des sphères ou mammosphères (MS). Le comptage cellulaire se fait à l'aide d'un compteur de cellules automatique TC10 (Bio-Rad, USA). Une fois le nombre requis de cellules prélevé et les cellules isolées, elles sontensemencées dans des boîtes de Pétri coatées et incubées pendant 24 h à 37°C en normoxie (21% O₂), hypoxie modérée (5% O₂) ou hypoxie sévère (1% O₂) dans du milieu de culture DMEM/F12

Tableau 6 Composition du tampon de lyse RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer)

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Acros Organics, USA)	50 mM ; pH 8
NaCl (VWR International, USA)	150 mM
NP-40 (Tableau X)	1 %
Sodium deoxycholate (Merck, USA)	0,5 %
SDS (Acros Organics, USA)	0,1%

Tableau 7 Composition du NP-40

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Acros Organics, USA)	20 mM ; pH 8
NaCl (VWR International, USA)	137 mM
Glycérol (Sigma, USA)	10 %
Nonidet P-40	1 %
EDTA (Acros Organics, USA)	2 mM

Tableau 8 Composition du Tampon d'échantillon

Composition	Concentration finale
SDS (Acros Organics, USA)	20 %
Bleu de bromophénol (UCB, Belgique)	1,5 %
Glycérol (Sigma, USA)	50 %
Tris-HCl (Acros Organics, USA)	1,25 M ; pH 6,8
β -mercaptoéthanol (Merck, USA)	20 %

Tableau 9 composition du Running gel (Gel de séparation)

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Acros Organics, USA)	375 mM ; pH 8,8
SDS (Acros Organics, USA)	0,1 %
Acrylamide/bis-acrylamide 40% (Bio-Rad, USA)	10%
Ammonium persulfate (APS ; Bio-Rad, USA)	0,05 %
Tétramethyl ethylen diamine (TEMED ; Bio-Rad USA)	0,01 %

Tableau 10 Composition du Stacking Gel (Gel de concentration)

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Acros Organics, USA)	125 mM ; pH 6,8
SDS (Acros Organics, USA)	0,1 %
Acrylamide/bis-acrylamide 40% (Bio-Rad, USA)	4%
Ammonium persulfate (APS ; Bio-Rad, USA)	0,075 %
Tétramethyl ethylen diamine (TEMED ; Bio-Rad USA)	0,1 %

(Table 5). Cette basse pression partielle en oxygène est obtenue en pompant de l'azote dans la chambre d'hypoxie (Biospherix, USA), celle-ci placée dans un incubateur humidifié. Il est important de noter qu'une fois les cellules placées dans ces conditions d'hypoxie, la chambre hypoxique est strictement maintenue fermée pour éviter toute modification d'atmosphère.

3. Extraction protéique et Western blot

A. Récupération des sphères

Pour récupérer les protéines totales contenues dans les MS de 24 h, la suspension cellulaire est tout d'abord recueillie dans des tubes de 50 ml (Corning, USA). Ces tubes sont ensuite centrifugés pendant 5 min à 15 g afin de récupérer les sphères contenant plus de 2 cellules. Le culot de sphères est alors transféré dans un tube de 15 ml, lavé une fois avec du PBS froid et centrifugé 5 min à 200 g. Les MS sont finalement transférées dans un microtube de 1,5 ml et centrifugées à 1000 g. Le PBS est décanté minutieusement et le culot sec est stocké à -80°C avant la lyse des cellules.

B. Extraction protéique et dosage

La lyse cellulaire se réalise en incubant le culot de sphères avec 50 à 100 µl de tampon de lyse RIPA (Radioimmunoprecipitation assay buffer, Table 6) durant 20 min à température ambiante. Enfin, les homogénats cellulaires sont centrifugés 10 mins à 13 000 g afin de récupérer la phase soluble surnageante (ou lysat clair). La concentration protéique des échantillons est déterminée à l'aide de la méthode du Pierce 660 nm protein assay reagent (Thermo Scientific, USA).

C. Préparation des échantillons

Sur le gel de séparation, 20 µg de protéines sont chargés. Au volume de protéines, qui est fonction de la concentration des échantillons, on ajoute 6 µl de tampon d'échantillon 5x (Table 8). L'addition de ce tampon d'échantillon permet d'alourdir les protéines et de leur conférer une charge négative proportionnelle à leur masse moléculaire. Le β -mercaptoéthanol permet quant à lui de maintenir les protéines en conformation dénaturée. Le mix est porté à volume de 30 µl en y ajoutant de l'eau distillée. Le tout est chauffé à 95°C pendant 5 min pour dénaturer les protéines.

D. Coulage des gels

La séparation des protéines se fait sur gels SDS-PAGE contenant 10 ou 12% d'acrylamide/bis-acrylamide et d'une épaisseur de 1,5 mm. Une fois le dispositif de coulage du gel monté et étanche, la procédure commence par le coulage du running gel (gel de séparation, Table 9). L'APS et le TEMED sont ajoutés au dernier moment car ils catalysent la polymérisation. De plus, l'oxygène inhibant la polymérisation du gel, une couche d'éthanol est déposée au-dessus du Running gel afin d'éviter le contact air-gel. Une fois polymérisé, l'éthanol est enlevé et on ajoute le mix du stacking gel (gel de concentration, Table 10). Un peigne 10-puits est inséré pour créer des pistes de migration au sein du stacking gel.

Tableau 11 Composition du Tampon de migration

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Acros Organics, USA)	25 mM ; pH 8,3
Glycine (Biosolve, Pays-Bas)	192 mM
SDS (Acros Organics, USA)	0,1 %

Tableau 12 Composition du Tampon de transfert

Composition	Concentration finale
Tris-HCl (Acros Organics, USA)	2,5 mM ; pH 8,3
Glycine (Biosolve, Pays-Bas)	192 mM
Méthanol (Roth, Allemagne)	20%

Tableau 13 Liste des anticorps et dilutions utilisées

Antigène reconnu	Anticorps primaire	Espèce	Anticorps secondaire
ER- α	IgG anti-estrogen receptor alpha (Abcam, Royaume- Uni) Dilution 1000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 680 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
β -Caténine	IgG anti- β -Caténine (BD Transduction Laboratories, USA) Dilution 1000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 680 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
Sox2	IgG anti-Sox2 (Cell Signaling Technolgy, USA) Dilution 500 x	Lapin	Anti-IgG de lapin IRDYE 800 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
Oct-4	IgG anti-Oct-4 (Cell Signaling Technolgy, USA) Dilution 500 x	Lapin	Anti-IgG de lapin IRDYE 800 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
Nanog	IgG anti-Nanog (Cell Signaling Technolgy, USA) Dilution 500 x	Lapin	Anti-IgG de lapin IRDYE 800 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
Actine	IgG anti- β -actine (Sigma, USA) Dilution 1000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 680 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 10000 x
HIF-1 α	IgG anti-HIF-1 α (BD Transduction Laboratories, USA) Dilution 500 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 680 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x

E. Migration électrophorétique

Avant d'entamer la migration à proprement dite, les gels sont placés dans une cuve de migration, en présence de tampon de migration (Table 11). Une fois les gels baignés dans ce tampon, 10 µl d'un étalon protéique est chargé sur l'une des pistes (ProSieve Protein marker, Lonza, Suisse). Ensuite les 30 µl de chaque échantillon préparé précédemment sont à leur tour chargés. Le SDS ajouté aux échantillons les dote d'une charge électrique négative proportionnelle à leur masse moléculaire. Donc, une fois soumises à une différence de potentiel, les protéines migrent alors dans le gel vers la cathode et se séparent en fonction de leur poids moléculaire. Avant d'entamer la migration proprement dite, les échantillons sont tout d'abord soumis à une différence de potentiel de 80 V pendant 30 minutes pour permettre leur concentration au bas du stacking gel. La séparation électrophorétique des protéines se déroule ensuite sous une tension de 120 V et pendant environ 1h.

F. Transfert sur membrane

Une fois la migration terminée, les gels sont extraits de leur support pour transférer les protéines sur une membrane Immobilon – FL (Millipore, USA) pour une révélation par immunofluorescence. Avant la mise en place du transfert, la membrane de transfert est trempée brièvement dans du méthanol puis conditionnée 10 min environ dans du tampon de transfert (Table 12). Un bain de 10 min dans le tampon de transfert est également requis pour le gel de migration. Le transfert se fait au sein d'un appareil de transfert semi humide (Hoefer, USA). Premièrement, l'appareil est humidifié avec un peu de tampon de transfert. Ensuite on empile deux morceaux de papier Wathman imbibés dans le tampon. Viennent alors successivement la membrane Immobilon, le gel de migration et encore deux morceaux de papier Wathman. Imbiber les papiers Wathman dans le tampon permet au courant électrique de passer correctement au travers de la membrane pour transférer les échantillons sur la membrane. Le transfert dure 2 h sous une tension constante de 20 V et une intensité de 60 mA par gel.

G. Révélation des protéines

Après le transfert des protéines sur la membrane Immobilon - FL, celle-ci est incubée pendant 1 h dans de le tampon de blocage Odyssey blocking buffer (Li-Cor Biosciences, USA) afin de réduire les liaisons aspécifiques des anticorps qui y seront ajoutés. L'anticorps primaire, dilué 500 à 1000x dans de l'Odyssey blocking buffer + 0,1 % de Tween (Polyéthylène sorbitan monolaurate) (Sigma, USA), est incubé jusqu'au lendemain matin, à 4°C. Chaque anticorps utilisé dans ce mémoire est repris dans la Table 13. Trois lavages successifs de 10 min chacun au PBS contenant 0,1% de Tween sont requis avant de pouvoir incuber durant une heure l'anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin couplé à un fluorochrome. Cet anticorps secondaire est dilué 5000x dans de l'Odyssey blocking buffer et 0,1 % de Tween. Il est nécessaire d'effectuer de nouveau 3 rinçages au PBS + Tween 0,1% pour évacuer les anticorps non liés, suivi d'un rinçage au PBS seul avant d'entamer la révélation. En effet, le tween a tendance à faire apparaître un bruit de fond durant la révélation donc ce dernier lavage permet de réduire le bruit de fond aspécifique.

Une fois la membrane prête, elle est déposée sur des feuilles de papier absorbant à l'abri de la lumière pour la faire sécher. Ce n'est qu'une fois sèche qu'il est possible de détecter la fluorescence émise par les fluorochromes couplés aux anticorps secondaires. La membrane est placée dans un scanner (Odyssey Licor) capable d'effectuer la lecture de la fluorescence

HIF-2 α	IgG anti-HIF-2 α (Novus Biologicals, USA) Dilution 500 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 680 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x
α -tubuline	IgG anti- α -tubuline (Sigma, USA) Dilution 1000 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 680 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 10000 x
CD44	IgG anti-CD44 (BD biosciences, USA) Dilution 500 x	Souris	Anti-IgG de souris IRDYE 680 nm (Li-Cor Biosciences, USA) Dilution 5000 x

émise (800 ou 680 nm en fonction de l'anticorps secondaire utilisé). Pour pouvoir quantifier l'expression de nos protéines d'intérêt, une normalisation doit être faite à l'aide d'un gène de référence. Il nous sert de contrôle de charge et permet ainsi d'observer d'éventuelles différences d'expressions dans les conditions expérimentales. Ici, l'actine est notre contrôle endogène. Après la révélation du gène d'intérêt, la membrane est trempée de nouveau brièvement dans du méthanol et bloquée 30 min avec du tampon de blocage Odyssey. L'anticorps anti-actine est incubé durant 30 min et dilué 1000 x dans l'Odyssey – Tween 0,1%. L'anticorps secondaire est lui aussi incubé après 3 lavages de la membrane au PBS – Tween 0,1%. Il est dilué 10 000 x dans de l'Odyssey et 0,1% de Tween. Comme pour le gène d'intérêt, la membrane est lavée trois fois 10 min au PBS – Tween 0,1% et une fois au PBS.

4. Extraction d'ARN, rétro-transcription et PCR quantitative

A. Extraction et purification d'ARN

Pour l'extraction d'ARN à partir des MS, la récupération de sphères se déroule comme indiqué à la section 3.A. (Récupération des sphères). Une fois le culot sec de sphères obtenu, il est ressuspendu dans 350 µl de tampon RLT (un tampon de lyse à base de guanidine-thiocyanate) (Qiagen, USA) avant d'être conservé à -80°C.

La purification d'ARN suit le protocole du kit RNeasy MinElute Cleanup (Qiagen, USA). Il est important de noter que toutes les manipulations qui vont suivre se déroulent dans une zone strictement RNase free, obtenue par traitement de la paillasse par une solution de SDS 1%. Chaque étape de centrifugation se déroule à 4°C afin d'éviter la dégradation de l'ARN. D'abord, 350 µl d'éthanol 70% est ajouté à l'échantillon. Le mélange est bien homogénéisé par de multiples allers-retours à la pipette de 1 ml. Le contenu total du microtube est alors transféré dans une colonne RNeasy MinElute spin column, elle-même placée sur un tube collecteur de 2 ml. La colonne est centrifugée 15 sec à 8000 g afin que l'ARN présent dans notre échantillon traverse le filtre et se lie à la membrane silica-gel. Le contenu du collecteur est évacué et 350 µl de tampon RW1 (tampon de lavage) sont ajoutés pour laver la membrane par une centrifugation de 15 sec à 8000 g. 80 µl d'un mix de DNase est alors ajouté sur la membrane durant 15 min pour éviter toute contamination d'ADN. La colonne est alors lavée avec 350 µl de tampon RW1 et centrifugée 15 sec à 8000 g. Pour enlever toute trace de sels au niveau de la membrane-ARN, 500 µl de tampon RPE est ajouté sur la colonne et le tout est centrifugé de nouveau 15 sec à 8000 g. 500 µl d'éthanol 80% sont ajoutés au sommet de la colonne avec une centrifugation 2 min à 8000 g avant de centrifuger la colonne capuchon ouvert à 14 000 g pendant 5 min. Cette étape conclut la procédure de purification de l'ARN et de séchage de la colonne. L'ARN est toujours lié à la membrane en gel silica. Pour finalement éluer l'ARN il faut placer la colonne sur un microtube collecteur de 1,5 ml et ajouter 20 µl d'eau RNase-free sur la membrane. Après 1 minute d'incubation, l'ARN est récupéré par centrifugation 1 minute à 14 000 g. La concentration d'ARN présente dans ces 20 µl est définie via un Nanodrop (Thermo Scientific, USA) grâce au spectre d'absorption de celui-ci à 260 nm. Cet ARN purifié est finalement stocké à -80°C.

B. Rétro-transcription

La PCR quantitative se basant sur de l'ADN, il faut en premier lieu rétro-transcrire l'ARN purifié en ADNc. En premier lieu, un volume équivalent à 500 ng d'ARN est mélangé à de l'eau RNase-free pour obtenir un volume total de 13 µl. Le microtube est alors chauffé à

Tableau 14 Table des amorces

Gène cible	Séquence amorce reverse	Séquence amorce forward
ER- α	GCTGTTCTTCTTAGAGCGTTTGA	GAAAGGTGGGATACGAAAAGACC
Sox2	GGCAGCGTGTA CTTATCCTTCT	GCCGAGTGGA AACTTTTGTCG
CD44	GGTGTGGTTGAAATGGTGCT	GCAACTGAGACAGCAACCAAG
Actine- β	CCCTTACACATCGGAGAACAG	CTGCTACCAGGACACGATTT
Bmi1	TTCAGTAGTGGTCTGGTCTTGT	CCACCTGATGTGTGTGCTTTG
E Cadherine	CCCTTG TACGTGGTGGGATT	TGGACCGAGAGAGTTTCCCT
Vimentine	TCCATTT CACGCATCTGGCGTTC	GAGGCTGCCA ACCGGAACAATG
Snail1	GCTGGAAGGTAAACTCTGGATT	GGTCTTCTGCGCTACTGCT
Bmi1	TTCAGTAGTGGTCTGGTCTTGT	CCACCTGATGTGTGTGCTTTG

70°C pendant 10 minutes et posé sur glace immédiatement après. Cette étape permet la dissociation d'éventuels ARN double brin et aussi la dissociation de structures secondaires des simples brins. La réaction de rétro-transcription est réalisée après ajout dans chaque échantillon de 4 µl de tampon M-MLV RT (Promega, USA), 1 µl d'hexamères aléatoires 5 µM (Invitrogen, USA), 1 µl de dNTP 10 mM (Promega) et 1 µl de M-MLV reverse transcriptase 200 u/µl (Promega). Le mélange du mix de rétro-transcription et de l'échantillon est incubé 5 minutes à température ambiante avant une incubation de 60 min à 42°C et de 5 min à 95°C. Les échantillons sont stockés à -20°C avant utilisation.

C. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

La qPCR permet de quantifier l'abondance d'un transcrit d'ARN au sein d'un échantillon. Une fois l'ARN total rétro-transcrit en ADNc, seul le gène d'intérêt est amplifié par la réaction de PCR grâce à des amorces spécifiques. Au cours de la réaction d'amplification, un agent intercalant (ici le SYBR Green) se lie aux molécules d'ADN double brin et émet un signal fluorescent. Il existe donc une relation de proportionnalité entre le nombre de fragments amplifiés et l'intensité de fluorescence. On définit le cycle seuil (ou Ct; Crossing Threshold) comme étant le point où la fluorescence émise par l'agent intercalant dépasse le bruit de fond. Au plus la quantité d'ADNc du gène d'intérêt (et donc d'ARN) est importante dans l'échantillon, au plus ce Ct est bas. A l'instar de l'analyse protéique par Western blot, les résultats en Ct obtenus par qPCR sont normalisés suivant l'expression d'un gène de référence dont l'expression ne varie pas entre les conditions. Dans notre cas, l'actine-β joue ce rôle. L'étude de son expression doit obligatoirement se faire simultanément que l'analyse du gène d'intérêt, pour réduire la variabilité.

La réaction de polymérisation s'effectue dans un puits d'une plaque 96 puits (Applied Biosystems, USA). Dans chaque puits, 20 µl d'un mix de qRT-PCR sera mélangé à 5 µl d'ADNc dilué 10 x. Le mix qRT-PCR est composé de 12.5 µl de FastStart Universal SYBR Green Master (Roche, Suisse), de 2,5 µl d'eau MilliQ, de 2,5 µl d'amorce reverse 3 µM et de 2,5 µl d'amorce forward 3 µM (Voir table des amorces, table 14). En plus de l'agent intercalant, le mix SYBR Green contient une ADN polymérase stable à haute température et des nucléotides (dNTP), permettant l'élongation des brins d'ADN. Une fois chaque puits rempli, la plaque est scellée par un film plastique autocolant et centrifugée brièvement avant analyse.

L'analyse est effectuée dans un appareil 7300 Real Time PCR System (Applied biosystems) suivant un programme précis : 2 minutes à 50°C et 10 minutes à 95°C suivis de 40 cycles de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C. Chaque échantillon est analysé en duplicats et l'expression de l'ARN est normalisée selon l'expression de l'actine, par la comparaison des Ct (méthode du $2^{-(ddCt)}$)¹³⁵. Le dCt représente la différence entre le Ct du gène d'intérêt et le Ct de l'actine alors que le ddCt représente la normalisation par rapport à un échantillon de référence, dans nos conditions, les sphères cultivées en normoxie. L'abondance relative est calculée par la formule $2^{-(ddCt)}$.

5. Formation de sphères primaires et secondaires

L'analyse du nombre de sphères formées dans les différentes conditions expérimentales nous donne un aperçu de l'activité des CSCs ou des progéniteurs. La formation de sphères secondaires permet une comparaison du nombre de sphères formées et ainsi une quantification de la capacité d'auto-renouvellement des cellules souches ou progénitrices.

L'effet de l'hypoxie sur la formation de sphères, primaires ou secondaire est analy-

sée dans un milieu de culture semi-solide, le méthyl cellulose (MC) (R&D Systems, USA). La culture dans ce milieu particulier permet d'éviter l'agrégation de sphères observées en culture non-adhérente classique, dans du milieu sans rouge phénol. En premier lieu, le stock de MC est décongelé toute une nuit à 4°C. Le lendemain, la solution est mixée énergiquement et placée sous hotte stérile, bouchon ouvert, pour permettre l'évacuation des bulles d'air. Le MC est dilué dans du milieu DMEM/F12 frais pour atteindre une concentration finale de 0,5%. Les cellules adhérentes sontensemencées à une densité de 150 cellules/cm² dans les conditions non-adhérentes des puits d'une plaque 24-puits Ultra-low attachment surface (Sigma, USA) et dans ce DMEM/F12 - MC 0,5%. Les sphères sont comptées après 7 jours de croissance en normoxie (21% O₂), hypoxie modérée (5% O₂) et sévère (1% O₂).

La formation des sphères secondaires se déroule en parallèle et commence comme expliqué à la section 2. Culture de mammosphères en conditions normoxique et hypoxiques, par un ensemencement de boîtes de Pétri coatés d'agarose. Après un jour, les sphères sont récupérées dans des tubes de 50 ml (Corning, USA), centrifugées 5 min à 15 g et ressuspendues dans 1 ml de PBS. Cette suspension de sphères est alors centrifugée 5 min à 200 g et le culot de cellules obtenu est incubé 10 min dans 100 µl de trypsine. Afin de correctement dissocier les cellules on effectue 21 aller-retours à la pipette de 200. Les cellules sont alors centrifugées 5 min à 200 g en présence de 800 µl de PBS avant d'être ressuspendues dans 500 µl de milieu DMEM/F12. Les cellules sont comptées et ensemencées à une densité égale à celle des sphères primaires mais incubées cette fois 7 jours en normoxie (21% O₂).

6. Mesure de l'activité transcriptionnelle d'ER-α

A. Transfection du plasmide rapporteur et formation de sphères

L'activité transcriptionnelle d'ER-α est mesurée par le biais d'un plasmide rapporteur ERE-Luc (Addgene plasmid 11354). Le plasmide code pour une luciférase de luciole sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant une triple séquence ERE. Donc, au plus le récepteur nucléaire est transcriptionnellement actif, au plus la quantité de luciférase produite est importante. Techniquement, 320 000 cellules MCF-7 sont ensemencées par puits d'une plaque 6-puits (Greiner Bio-One, Allemagne) dans du milieu DMEM avec FBS traité au charbon. 72 h plus tard, les cellules sont transfectées par la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA) avec 4 µg/puits de plasmide d'expression ERE-Luc et 240 ng/puits d'un plasmide servant à la normalisation codant lui pour une luciférase de *Renilla reniformis*. De façon pratique, pour la transfection des cellules d'un puits, on ajoute dans un premier tube les 4 µg de plasmide ERE-Luc, les 240 µg de plasmide de normalisation et 250 µl de milieu Opti-MEM (Gibco, USA). Le deuxième tube est composé de 8 µl d'agent transfectant et de 250 µl d'Opti-MEM. L'Opti-MEM est le milieu recommandé pour la transfection de cellules par lipides cationiques (comme la Lipofectamine 2000). Après 5 minutes, les tubes 1 et 2 sont mélangés. Il faut 20 minutes pour que les complexes Lipofectamine/Plasmides se forment. Avant d'ajouter le mélange dans les puits contenant les cellules, il faut ajouter 1,5 ml de milieu DMEM avec FBS traité au charbon pour obtenir un volume total de 2 ml de solution par puits. Après 4 h de transfection, le milieu est remplacé par du DMEM avec FBS traité au charbon après un lavage au PBS. Les cellules sont récupérées 24 h après la fin de la transfection par l'ajout de 500 µl de trypsine pendant 5 minutes et sont alors ensemencées de façon identique à la méthode décrite à la section 2. L'activité du récepteur est quantifiée dans des sphères en conditions basales ou cultivées en présence de 10 nM d'E₂ et dans les trois conditions de concentration en oxygène (21%, 5% et 1%).

B. Récupération des sphères transfectées

Les sphères de 24 h formées par les cellules transfectées sont récupérées dans des tubes de 50 ml et centrifugées 5 min à 15 g. Le surnageant est enlevé par aspiration et les culots de sphères de conditions identiques sont mis en commun dans un tube de 15 ml. Les tubes sont alors centrifugés 5 min à 200 g. Le surnageant est aspiré pour ne laisser que 1 ml qui sera homogénéisé et transféré dans un microtube de 1,5 ml. Le culot de sphères obtenu après 5 min de centrifugation à 200 g est alors ressuspendu dans 250 μ l de Tampon de lyse passif 1x, inclus dans le Dual-Luciferase reporter assay system (Promega).

C. Révélation de l'activité des luciférases

Les réactions catalysées par les deux luciférases sont des réactions émettrices de lumière. La quantification de l'activité des luciférases se fera donc avec un luminomètre single-sample (Berthold, Allemagne). Les deux luciférases fonctionnant à partir de substrats différents, la lecture de l'intensité lumineuse se fait successivement. D'abord, on ajoute 20 μ l d'échantillon dans 100 μ l de tampon LAR II (Luciferase assay reagent 2). Une première lecture indique l'intensité de luminescence de la luciférase de luciole, proportionnelle à l'activité transcriptionnelle d'ER- α . Ensuite, on ajoute 100 μ l de la solution Stop and Glo pour interrompre la première réaction et fournir le substrat à la deuxième luciférase, servant de contrôle. Le rapport de l'intensité de luminescence de la première luciférase et de la deuxième nous donne la normalisation de l'activité d'ER- α .

7. Analyse de l'activité de l'ALDH1

L'expression de l'enzyme ALDH1 intervenant très tôt dans le processus de différenciation des cellules souches, cette protéine peut jouer le rôle de marqueur des cellules souche ou de CSCs. En étudiant l'activité de cette enzyme dans la population de cellules, il est possible de détecter les CSCs et donc de comparer l'enrichissement en CSCs dans nos conditions expérimentales. La quantification de l'activité de l'enzyme se fera via le kit AldefluorTM développé par Stem cell technologies (Canada). Le principe du kit repose sur l'entrée dans les cellules d'un composé, le BODIPYTM-aminoacétaldéhyde (BAAA). La conversion du BAAA en un composé fluorescent non toxique est dépendante de l'activité de l'ALDH1 et la quantité de ce produit enzymatique est alors mesurée par cytométrie de flux.

Techniquement, les MS sont récupérés et centrifugés 5 min à 9 g. Le surnageant est aspiré jusqu'à ne laisser qu'environ 1 ml, qui est alors transféré dans un microtube de 1,5 ml. On centrifuge cette fois les tubes 5 min à 200 g pour récupérer les cellules qui se seraient éventuellement dissociées lors du transfert dans le tube. Le culot est ressuspendu dans 100 μ l de trypsine-EDTA une fois le milieu décanté au maximum et est incubé 10 min à 37°C. Pour bien dissocier les agrégats, on effectue 15 allers-retours à la pipette de 1 ml. Pour se débarrasser de la trypsine, on ajoute 1 ml de PBS et on effectue 3 nouveaux passages à la pipette de 1 ml, avant de centrifuger 5 min à 200 g. Le culot est alors ressuspendu dans 1 ml d'Aldefluor assay buffer. De cette suspension, 20 μ l sont prélevés pour réaliser un comptage (Compteur automatique TC10) et 500 μ l sont placés dans un nouveau microtube pour devenir le contrôle négatif (tube CN). Dans le tube CN, 5 μ l de DEAB (diéthylaminobenzaldéhyde, un inhibiteur de l'ALDH1) sont ajoutés ainsi que 5 μ l de BAAA. Dans les tubes tests, seuls les 5 μ l de BAAA sont ajoutés. Les tubes sont ensuite incubés 45 min à 37°C. Les cellules mises de côté pour le compté sont alors comptées à l'hémocytomètre automatique. Après

l'incubation de 45 min, les cellules sont centrifugées 5 min à 200 g et le culot de cellules est ressuspendu dans 500 μ l d'Aldefluor assay buffer. À partir de ce moment les cellules sont incubées sur glace et dans l'obscurité. De cette suspension, un deuxième comptage est réalisé pour pouvoir observer la mortalité due à l'incubation, en comparant avec le premier comptage. Si plus de 15 % de mortalité est observé, il faut marquer les cellules avec de l'iodure de propidium. L'analyse de la fluorescence se réalisant au FACS, il sera alors possible de séparer les cellules vivantes et mortes en plus de l'analyse de l'activité de l'ALDH suivant le taux de fluorescence.

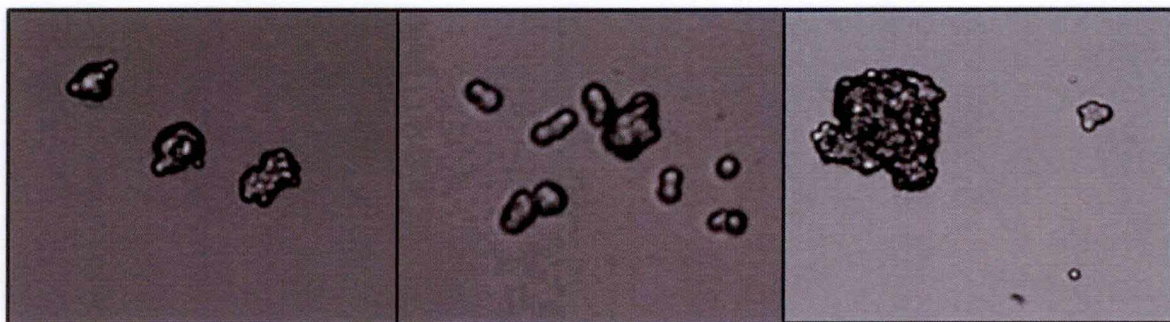


Figure 13 Image en contraste de phase de MS de cellules MCF-7 obtenues après 24 h d'incubation en normoxie. Images représentatives de l'hétérogénéité des MS en contraste de phase, grossissement 100 x. La suspension de cellules MCF-7 isolée est ensemencée dans des boîtes de Pétri coatées à l'agarose, à une densité de 1000 cellules/cm² dans du milieu DMEM/F12 observées ici après 24 h d'incubation.

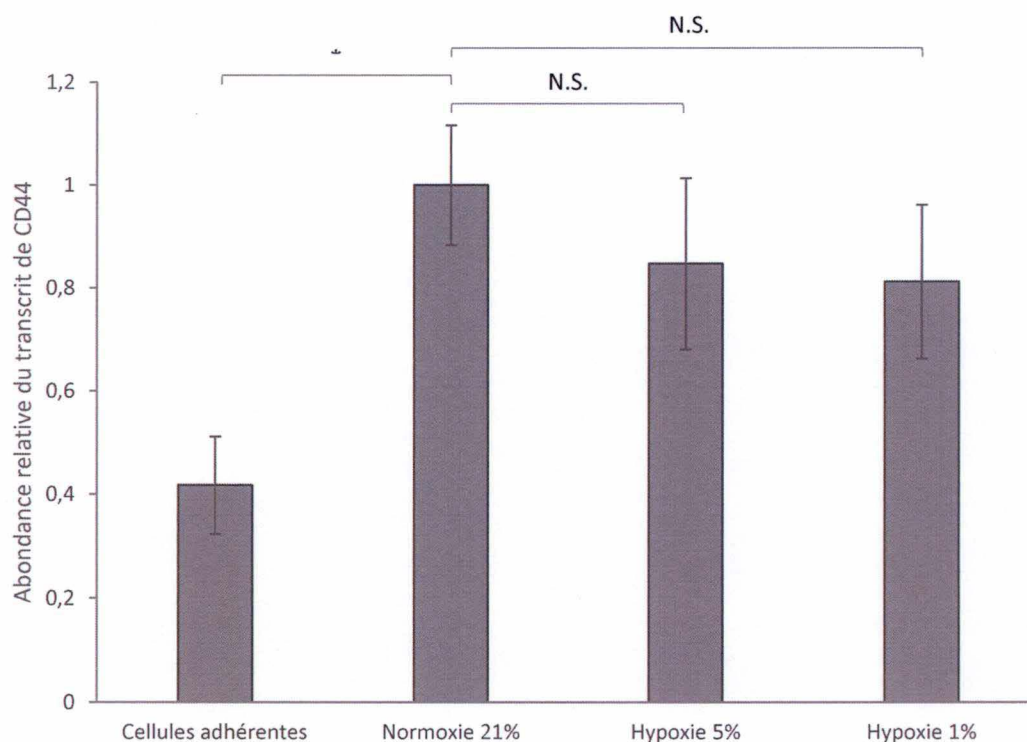


Figure 14 Analyse de l'expression relative de l'ARNm de CD44 dans des cellules MCF-7 adhérentes dans des MS incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 24 h. L'ARN total extrait des cellules adhérentes ou des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à CD44 et de SYBR Green. L'actine- β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'abondance d'ARNm des sphères de 24 h \pm SEM. (MS n=9, cellules adhérentes n=3). * : Significativement différent de l'expression obtenue dans les cellules adhérentes, avec un $p < 0,05$, obtenu par le test de Student (Adhérentes vs Normoxie) et N.S : Non-significatif, déterminé par une ANOVA I suivie d'une comparaison multiple de Tukey (Normoxie vs Hypoxie).

Résultats et discussion

La première partie de notre travail a été dédiée à la caractérisation du modèle expérimental utilisé. Toutes les analyses réalisées dans le cadre de cette étude ont été effectuées sur des mammosphères (MS) après 24 h d'incubation en normoxie ou hypoxie sévère ou modérée. Ce timing a été sélectionné d'une part sur base de données présentes dans la littérature, montrant par exemple qu'il existe un enrichissement en CSCs et en progéniteurs en culture non-adhérente après déjà 16 h, étant donné qu'après moins de 5 h les cellules différenciées meurent par anoïkis^{136,137} et d'autre part sur base de résultats générés au laboratoire suggérant que le nombre de CSCs présentes dans les MS diminue au cours du temps (données non publiées). Comme vous pouvez le voir à la figure 13, après 24 h d'incubation les MS ont des formes et tailles hétérogènes. Donc, dans les paragraphes suivant nous avons analysé la sphere forming efficiency (SFE) ainsi que l'expression et l'abondance de marqueurs de CSCs.

1. Analyse de l'expression de différents marqueurs de CSCs dans des cellules adhérentes et MS incubées en normoxie ou hypoxie sévère ou modérée

Pour mesurer l'enrichissement en CSCs dans nos conditions expérimentales d'hypoxie modérée ou sévère, nous avons eu recours à différentes techniques. Nous avons analysé l'expression des gènes codant pour CD44 (une protéine transmembranaire de la membrane plasmique) et Sox2 (un facteur de transcription) car ces derniers sont couramment décrits dans la littérature comme étant surexprimés par les CSCs^{65,138}. La figure 14 montre que l'expression du gène codant pour CD44 augmente de manière significative dans les MS incubées en normoxie par rapport aux cellules adhérentes. Par contre, l'expression de ce gène n'est significativement pas différente dans les MS incubées pendant 24 h en hypoxie modérée ou sévère. D'autre part, l'expression du marqueur Sox2 ne semble pas varier entre aucune des conditions, aucune augmentation significative de l'abondance du transcrit de ce marqueur n'est observé dans notre modèle (Fig. 15).

Sachant que l'augmentation d'abondance de Sox2 peut résulter de modification de la stabilité de la protéine^{139,140}, nous avons continué notre travail en analysant l'abondance de ce facteur de transcription par Western Blotting. L'abondance d'Oct-4 et de la β -caténine, deux autres régulateurs majeurs de l'activité des CSCs a également été analysée¹⁴¹⁻¹⁴³. Ces deux protéines ont également été décrites comme étant plus exprimées dans les CSCs que dans une population de cellules cancéreuses différenciées^{94,118}. L'abondance protéique de la β -caténine ne semble pas différente entre les cellules adhérentes et les MS cultivées en normoxie ou en hypoxie (Fig. 16). Oct-4, le facteur de transcription associé à la pluripotence des cellules, semble par contre montrer une abondance plus élevée dans les sphères incubées en normoxie que dans les cellules adhérentes. Si l'on compare ces résultats avec ceux des MS incubées en hypoxie modérée ou sévère, il semblerait de plus y avoir une augmentation d'abondance si les sphères sont cultivées en hypoxie, différence plus marquée en hypoxie modérée (5% d'O₂) que sévère (1% O₂). De manière intéressante, le contraste est plus marqué encore pour Sox2 quand on compare l'abondance dans les cellules adhérentes et dans les MS cultivés en normoxie. D'une manière générale Sox2 semble plus abondant dans les MS (Fig. 16).

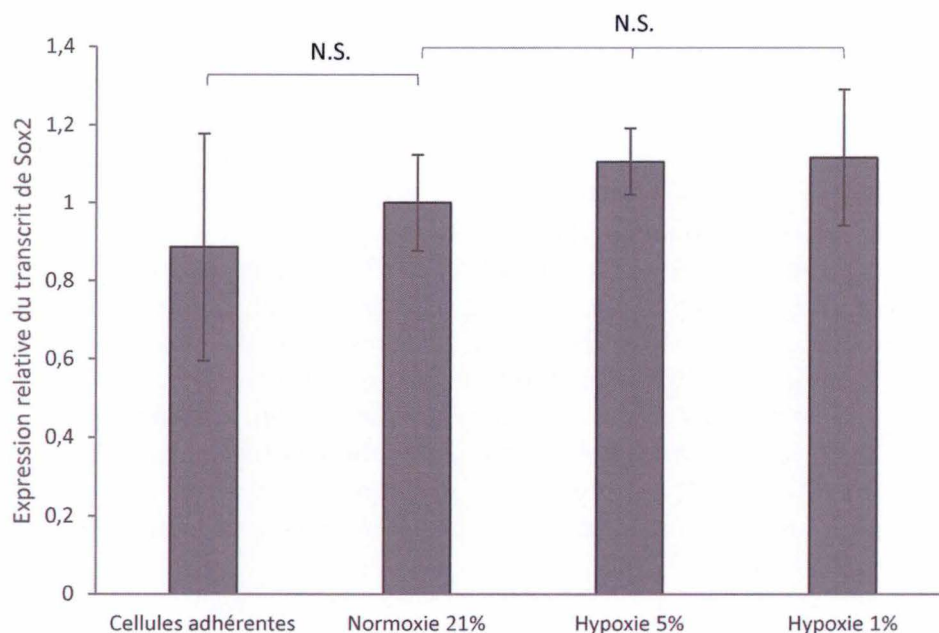


Figure 15 Analyse de l'expression relative de l'ARNm de Sox2 dans des cellules MCF-7 adhérentes dans des MS incubées en normoxie ou en hypoxie pendant 24 h. L'ARN total extrait des cellules adhérentes ou des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à Sox2 et de SYBR Green. L'actine-β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'expression d'ARNm des sphères de 24 h +/- SEM (MS n=9, cellules adhérentes n=3). N.S. : Non significatif, déterminé par un test de Student (Adhérentes vs Normoxie) et une ANOVA I suivie d'une comparaison multiple de Tukey (Normoxie vs Hypoxie).

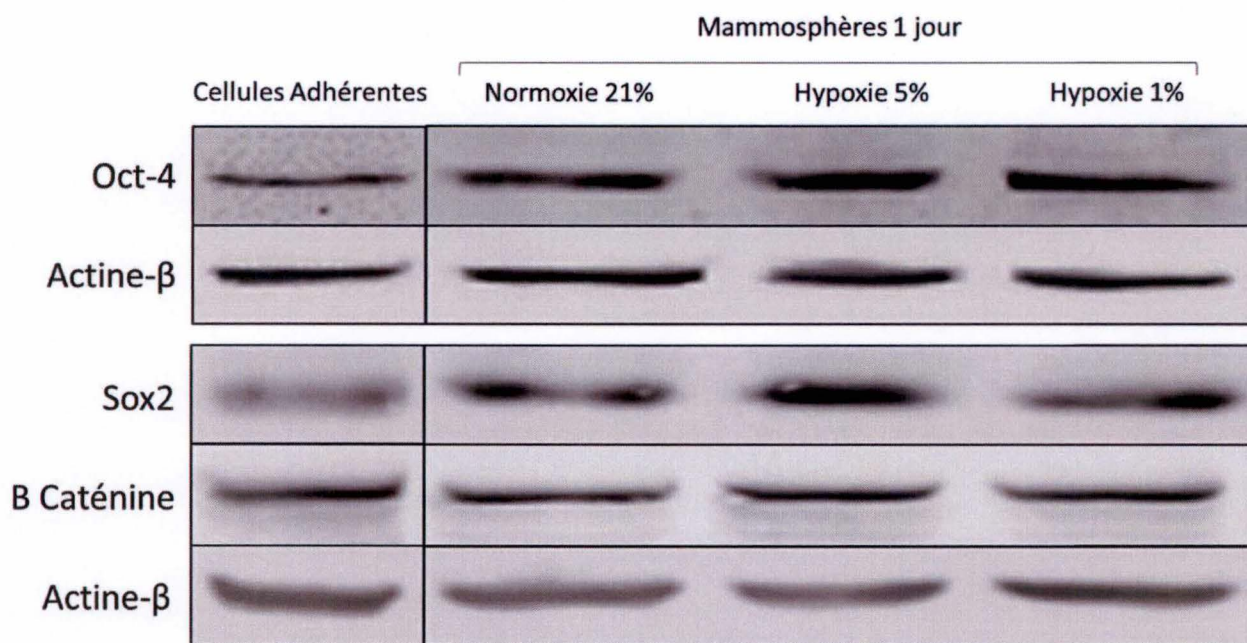


Figure 16 Analyse de l'abondance par western blot de la β-Caténine, Sox2 et Oct-4 dans des cellules MCF-7 adhérentes des MS incubées en normoxie ou en hypoxie durant 24 h. L'abondance d'Oct-4, Sox2 et de la β-Caténine a été analysée par Western blot de 20 µg de protéines d'un lysat clair de cellules adhérentes ou de sphères de 1 jour cultivées en normoxie (21% O₂), hypoxie modérée (5% O₂) et sévère (1% O₂). La détection a été réalisée grâce à des anticorps primaires monoclonaux anti-Oct-4 et anti-Sox2 de lapin et anti-β-caténine de souris. La charge protéique a ensuite été vérifiée par immunodétection de l'actine-β par un anticorps monoclonal anti-actine-β de souris. Ces anticorps primaires ont ensuite été détectés par un anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué au fluorochrome IRDYE 680 nm ou d'un anticorps secondaire anti-IgG de lapin couplé au fluorochrome IRDYE 800 nm. Les images représentent des expériences réalisées en triplicats.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction (3.B.c. Origine et fonction des CSCs), les CSCs surexpriment différents membres de la famille d'enzyme ALDH comme ALDH1^{77,144}. Cette enzyme serait notamment impliquée dans les phénomènes de résistance aux traitements chimio- et radio- thérapeutiques. Une technique couramment utilisée dans la littérature repose sur la mesure de l'activité de l'ALDH1 pour identifier un enrichissement en CSCs^{83,145}. Dans notre travail nous avons utilisé le kit commercial Aldefluor (Stem cells technologies). Le principe de l'analyse se base sur l'entrée dans les cellules d'un composé fluorescent non toxique, le BAAA (BODIPY®-aminoacetaldehyde). Dans le cytoplasme, ce composé peut être modifié en BAA (BODIPY®-aminoacetate) par l'enzyme ALDH1 ce qui rend le composé anionique et incapable de traverser la membrane plasmique. Les cellules possédant une haute activité d'ALDH1, comme les CSCs, auront donc une accumulation de cette molécule dans le cytoplasme et apparaîtront fortement fluorescente lors d'analyse en cytométrie de flux. Les résultats obtenus par cette expérience ne montrent pas de différence significative d'activité enzymatique ALDH1, que ce soit entre les cellules adhérentes et les sphères, ou entre les conditions d'oxygène auxquelles ces dernières sont exposées (Fig. 17).

En résumé, les expériences décrites jusqu'ici nous ont montré une augmentation de l'abondance protéique d'Oct-4, accompagnée de celle de Sox2. Cependant en ce qui concerne Sox2, cette augmentation d'abondance n'est pas corrélée à une augmentation de la transcription de son gène, suggérant l'intervention de mécanismes influant sur la stabilité de la protéine. Il est d'ailleurs connu dans la littérature que des modifications post-traductionnelles du facteur de transcription, comme une phosphorylation sur la tyrosine 118 par exemple, influent sur sa stabilité et augmentent son temps de demi-vie^{140,146}. En plus de ces augmentations, on observe également une augmentation de l'abondance du transcrit de CD44 dans les MS de 24 h comparée aux cellules adhérentes. L'augmentation de l'expression ou de l'abondance de ces trois marqueurs suggère donc un enrichissement en CSCs de la population de MS, comparé à une population de cellules adhérentes. Tous les marqueurs étudiés ne confirment pas cette augmentation en CSCs, notamment l'activité de l'ADLH1 ou l'abondance de la β -caténine qui ne varient pas entre les conditions. Cependant il est connu que les différents marqueurs utilisés ne réfèrent pas à une seule et unique population de CSCs mais qu'ils identifient plutôt des sous-populations différentes de CSCs et/ou de progéniteurs⁸⁷.

2. Effets de l'hypoxie modérée et sévère sur la population de CSCs

L'analyse de la SFE de la lignée MCF-7 a nécessité d'ensemencer les cellules en conditions clonogéniques, à très faible densité cellulaire. Pour établir la capacité à former des sphères de notre population de cellules MCF-7, celles-ci sont ensemencées à une densité très basse (150 cellules/cm²) et le nombre de sphères est compté au microscope après 7 jours. Cependant, dans ces conditions de culture, il semble que les sphères s'agrégeaient pour ne former qu'une immense sphère au centre du puits, accompagnée par quelques rares sphères plus petites. Ce phénomène est d'ailleurs décrit dans la littérature comme étant une fusion de sphères^{147,148} et rendu possible par les capacités de motilité que celles-ci possèdent. Des cellules différenciées peuvent également s'agréger et former des amas de cellules¹⁴⁹. Pour contrer ce problème, les cellules ont été ensemencées dans un milieu composé de DMEM/F12 contenant 0,5% de méthyl cellulose. Ce milieu semi-solide est connu comme empêchant la fusion des sphères mais préservant leur croissance^{150,151}. Dans ces conditions, on observe un nombre plus élevé de sphères de plus petite tailles ce qui suggère que la croissance des sphères a pu s'établir de façon normale, comme décrit dans la littérature⁹⁰.

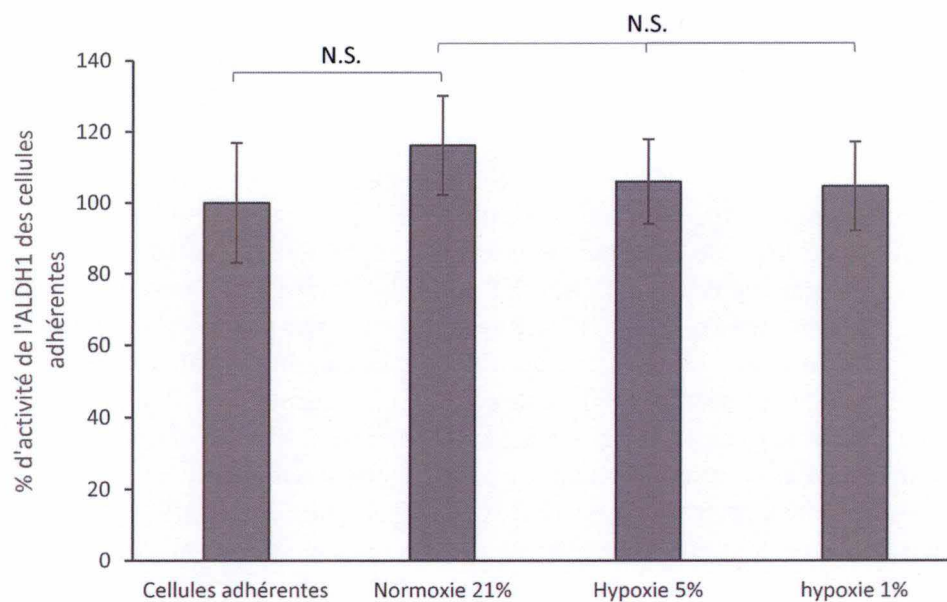


Figure 17 Analyse de l'activité de l'enzyme ALDH1 dans des MCF-7 adhérentes ou des MS incubés 24 h en normoxie ou hypoxie. L'analyse de l'activité ALDH1 a été réalisée à l'aide du kit Aldéfluor (Stem Cell technologies) (comme décrit dans la section matériel et méthodes. Les résultats sont exprimés sous la forme du pourcentage d'activité de l'ALDH1 des cellules adhérentes et représentent la moyenne \pm SEM (MS $n=4$, cellules adhérentes $n=3$). N.S. : Non significatif, déterminé par un test de Student (Adhérentes vs Normoxie) et par une ANOVA I suivie d'une comparaison multiple de Tukey (Normoxie vs Hypoxie).

La mesure de l'effet de l'hypoxie sur la population de CSCs dans les MCF-7 a donc pu être réalisée en ensemençant ces cellules en conditions non-adhérentes pour la formation de MS. La mesure du nombre de MS formés dans les conditions de normoxie ou d'hypoxie permet d'observer l'enrichissement en cellules souches de la population. Dans nos conditions expérimentales, aucune différence significative d'un point de vue morphologique n'est observé, il n'y a que peu de différences de forme ou de taille des sphères (Fig. 18 A). Toutes possèdent un diamètre et une forme plutôt régulière. De plus, il n'y a pas de différence pour le nombre de sphères primaires obtenues en fonction de la concentration en oxygène (Fig. 18 B).

La formation de mammosphères ne permet pas seulement de mesurer l'enrichissement de la population de CSCs. Il est possible de mesurer également la capacité d'auto-renouvellement de ces CSCs. Dans ce but, les sphères primaires sont récoltées et les cellules les constituant sont dissociées et à nouveau ensemencées pour former des sphères secondaires (ou MS2). Observer le nombre de MS2 formés par rapport au nombre de MS1 dans les mêmes conditions permet alors de mesurer la capacité d'auto-renouvellement des CSCs. À la figure 18 B sont représentées ces deux mesures, les MS1 et MS2. Quel que soit la concentration en oxygène du milieu, le nombre de MS2 est plus élevé (et de manière significative) que celui des MS1. La signification de la différence a été établie sur base d'une ANOVA II. Une augmentation de MS2 par rapport au nombre de MS1 peut être due à une augmentation en CSCs dans les MS1, qui pourrait suggérer des modifications dans l'activité d'auto-renouvellement de celles-ci. Le test de Bonferroni, effectué après l'ANOVA II, permet de comparer l'augmentation du nombre de sphères observé dans chaque condition d'oxygène (21%, 5% et 1% d'O₂). Les résultats de ce test indiquent que l'augmentation de MS est hautement significative quand elles sont incubées en hypoxie modérée et non significative dans les deux autres conditions.

Dans les précédentes expériences d'analyse du nombre de sphères formées en fonction de l'hypoxie, il a été montré que lorsque des cellules ER⁺ (telles que les MCF-7) sont pré-incubées à 1% d'O₂, le nombre de MS1 formées après 5 jours est augmenté par rapport à des cellules étant restées en normoxie lors de la culture adhérente. Cette incubation des cellules adhérentes en hypoxie induisait au contraire une diminution du nombre de sphères pour des lignées ER⁻ ¹²⁹. Il a d'ailleurs pu être montré que c'est l'isoforme HIF-1 α qui médie cet effet étant donné que son inhibition supprime l'effet observé ^{129,152}. Dans nos conditions, l'hypoxie n'intervient que lors de la culture non-adhérente et ici, aucune différence dans le nombre de MS1 n'est observée après 7 jours. Ce n'est que lors de la génération de sphères secondaires que la différence s'est marquée, principalement en hypoxie modérée. L'augmentation du nombre de MS2 formées par rapport au MS1 que nous rapportons ici a été observées également par le passé, pour des cellules MCF-7 maintenues en normoxie ¹⁵³.

À notre connaissance, l'impact d'une concentration en oxygène de 5 % sur la formation de sphère n'a pas été rapporté. Il est visiblement intéressant d'étudier cette condition d'hypoxie étant donné que l'augmentation du nombre de MS2 est significative. Dans cette condition, il y a visiblement une influence de l'hypoxie sur l'activité et les capacités d'auto-renouvellement des CSCs. C'est d'ailleurs dans cette condition que Sox2 et Oct-4 semblaient les plus exprimés (Fig. 16). Pour rappel, ces deux facteurs de transcription régulent justement les capacités d'auto-renouvellement des CSCs donc une augmentation de leur expression en hypoxie modérée pourrait activer cette caractéristique des CSCs.

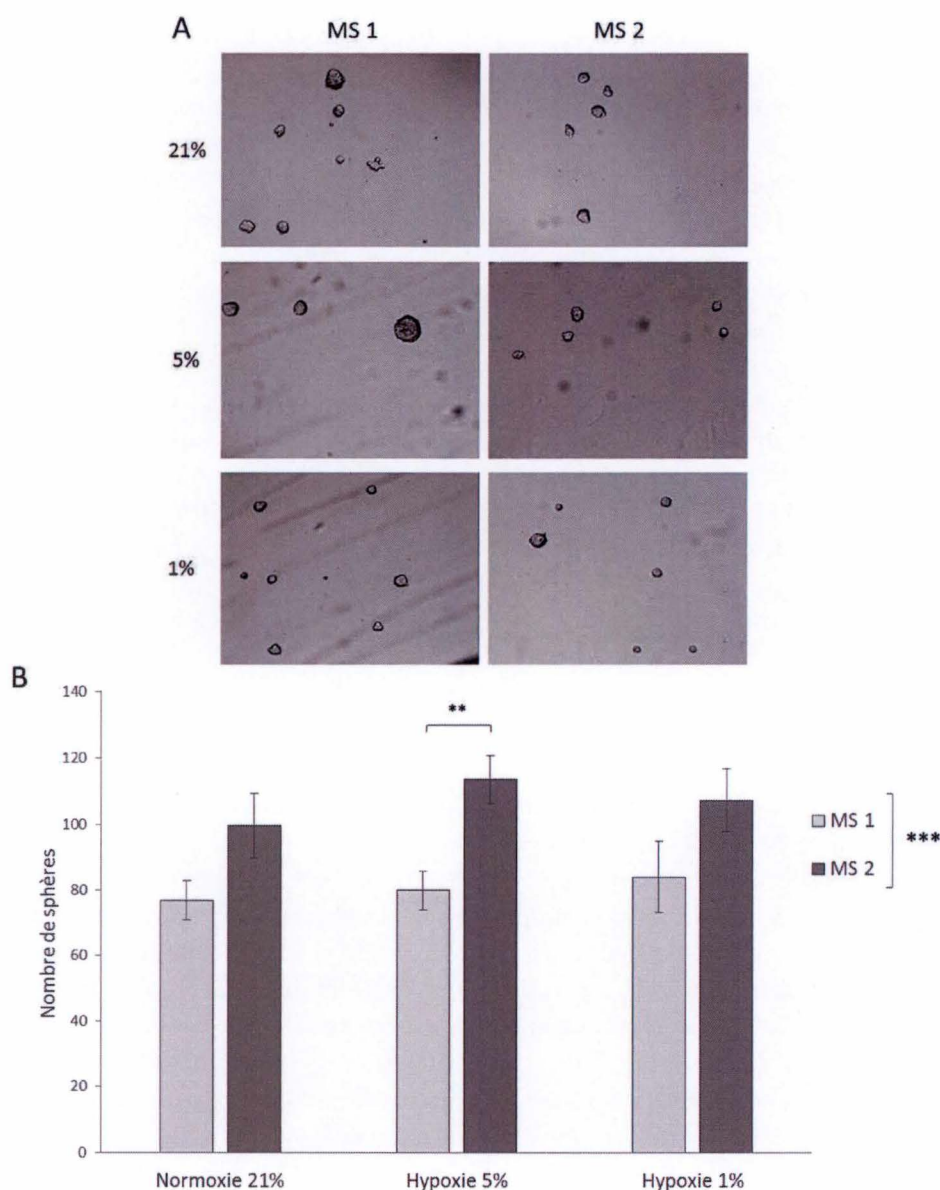


Figure 18 Analyse de l'effet de l'hypoxie sur la formation de sphères primaires (MS1) et secondaires (MS2) de MCF-7. (A) Image représentative en contraste de phase des sphères primaires (MSI) et secondaires (MSII), grossissement 40x. La suspension de MCF-7 isolés est cultivée Durant 7 jours à densité de 150 cellules/cm² dans du milieu DMEM/F12 + 0,5% de méthyl cellulose, dans différentes conditions hypoxiques (21%, 5% and 1% of O₂) et dans des puits d'une plaque 24-puits ultra-low attachment. (B) Analyse du nombre de MS1 et MS2 formés en hypoxie. Les sphères sont ensemencées à une densité de 150 cellules/cm² dans du milieu DMEM/F12 + 0,5% de méthyl cellulose et dans des puits d'une plaque 24 puits ultra-low attachment. Le comptage est réalisé au microscope à un grossissement de 40 x, après 7 jours d'incubation en normoxie (21% O₂), en hypoxie modérée (5% O₂) ou en hypoxie sévère (1% O₂). Les valeurs représentent la moyenne \pm SEM de 6 expériences indépendantes (n=18 pour MS1 21% et 5% et MS2 5% d'O₂, n=14 pour MS1 1% d'O₂, n=15 pour MS2 21% et n=17 pour MS2 1% d'O₂). *** : Très hautement significativement différent de l'activité obtenue dans les MS1, avec un p<0,001, obtenu par ANOVA II. ** : Très significativement différent du nombre de sphères obtenu dans les MS1, avec un p<0,01, obtenu par le post-test de Bonferroni.

3. Analyse de l'expression de marqueurs de l'EMT dans des cellules adhérentes et des mammosphères incubées pendant 24 h en normoxie et hypoxie

Comme expliqué précédemment, la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) est un processus jouant un rôle essentiel dans l'embryogenèse et dans la formation des CSCs. L'EMT serait, par exemple, impliquée dans le processus de dédifférenciation de cellules cancéreuses en CSCs^{11,69}. Il a été décrit que des cellules ayant suivi l'EMT possédaient des caractéristiques de cellules souches (capacités d'auto-renouvellement, survie en conditions non-adhérentes,...), étaient comparables aux CSCs par leur capacité à former une tumeur hétérogène au départ d'un nombre limité de cellules lors de xénogreffes, et surtout avaient la capacité de former plus de MS¹⁵⁴. Dans certains modèles, la formation de sphères est d'ailleurs accompagnée de l'acquisition de caractère mésenchymateux, par la progression de l'EMT et l'acquisition des marqueurs associés¹⁵⁵. Nous avons donc voulu savoir si l'EMT pouvait être activé dans les MS de 24 h. Une méthode fréquemment utilisée dans la littérature pour étudier l'EMT repose sur l'analyse de l'expression génique de différents marqueurs comme Snail1, Twist, E- et N-cadhérine, Bmi-1, la vimentine,...¹⁵⁶. Nous avons donc procédé à l'analyse par RT-qPCR de l'expression des gènes codant pour Snail1, la vimentine, la E-cadhérine et Bmi-1 dans des cellules adhérentes et des MS incubées pendant 24 h en normoxie ou en hypoxie modérée et sévère.

Snail1 est l'un des facteurs de transcription central de l'EMT. En effet, ce régulateur transcriptionnel induit la diminution d'expression de la E-cadhérine, qui est une molécule d'adhésion cellulaire et dont la diminution d'expression constitue une étape importante dans l'acquisition du phénotype mésenchymateux et des caractéristiques de motilité^{157,158}. De plus, Snail1 favorise l'expression de la vimentine, une protéine de la famille des filaments intermédiaires du cytosquelette, dont l'expression est connue pour augmenter lors de l'EMT, et qui dote également les cellules de caractéristiques mésenchymateuses et de motilité¹⁵⁹. Nous avons également étudié dans notre modèle l'expression de Bmi-1, une protéine remodelant la chromatine et connue comme étant impliquée dans l'EMT en régulant l'expression de différents gènes, notamment celui de l'E-cadhérine¹⁶⁰. De plus cette protéine est connue comme favorisant les propriétés d'auto-renouvellement des cellules dans le cancer du sein notamment, conférant à la tumeur une plus grande agressivité¹⁶¹.

En ce qui concerne l'étude de l'expression de l'E-cadhérine et de Bmi-1, aucune différence significative d'expression n'a pu être mise en évidence entre les conditions, que ce soit en comparant l'expression dans les cellules adhérentes et les MS en normoxie, ou bien entre les MS incubés en normoxie ou hypoxie (Fig. 19). La vimentine est un autre marqueur de l'EMT fréquemment décrit. Dans nos conditions, on n'observe pas de différence significative d'expression entre les cellules adhérentes et les MS incubés en normoxie (Fig. 20). Ensuite, si l'on compare l'expression de ce gène à 21%, 5% ou 1% d'O₂ dans les MS, on note par contre que l'hypoxie sévère induit une augmentation significative de l'expression du gène comparé à la normoxie, comme déterminé par une Anova I suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey. Cette induction n'est pas significative entre l'hypoxie modérée et la normoxie, ni entre l'hypoxie modérée et sévère. La figure 21 montre que l'expression de Snail1 augmente de manière significative dans les MS cultivés en normoxie par rapport aux cellules adhérentes. De plus, de manière intéressante, on observe que l'hypoxie modérée induit une augmentation significative de l'expression de Snail1 (+ 66 %). Dans la littérature, une augmentation de Snail1 a d'ailleurs déjà été décrite lors de la culture de MS¹⁶². Une hypoxie sévère (1% O₂)

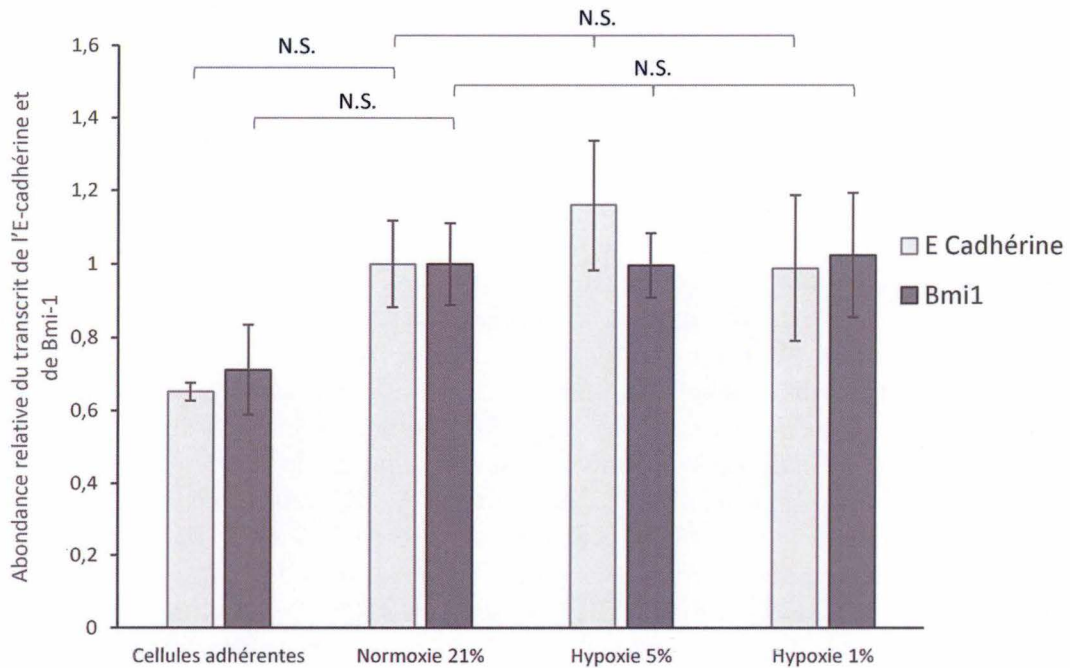


Figure 19 Analyse de l'expression relative de l'ARNm de Bmi1 et de la E cadhérine dans des cellules MCF-7 adhérentes et des MS de 24 h incubés en normoxie ou en hypoxie. L'ARN total extrait des cellules adhérentes ou des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère, a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à Bmi1 ou à la E cadhérine et de SYBR Green. L'actine-β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'expression d'ARNm des sphères de 24 h +/- SEM (MS n=9, cellules adhérentes n=3). N.S. : Non significatif, déterminé par un test de Student (Adhérentes vs Normoxie) et une ANOVA I suivie d'une comparaison multiple de Tukey (Normoxie vs Hypoxie).

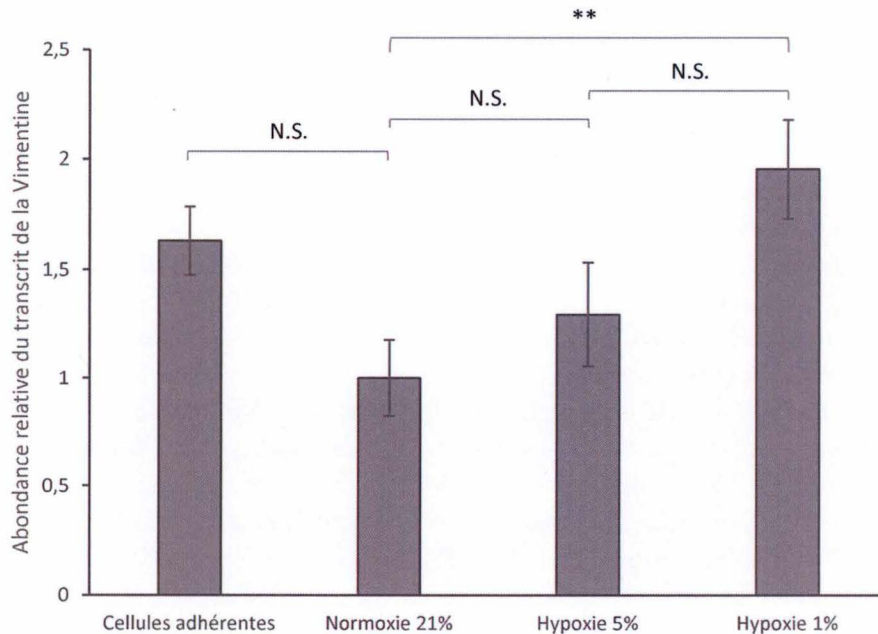


Figure 20 Analyse de l'expression relative de l'ARNm de la Vimentine dans des cellules MCF-7 adhérentes et des MS incubés 24 h en normoxie ou en hypoxie. L'ARN total extrait des cellules adhérentes ou des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à la Vimentine et de SYBR Green. L'actine-β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'expression d'ARNm des sphères de 1 jour +/- SEM (MS n=9, cellules adhérentes n=3). **: Différence d'expression hautement significative ($p < 0.01$), N.S. : Non significatif, déterminé par un test de Student (Adhérentes vs Normoxie) et une ANOVA I suivie d'une comparaison multiple de Tukey (Normoxie vs Hypoxie).

dans des lignées cellulaires hépatiques telles que les HepG2 et les SMMC-7721 est également connue comme induisant une augmentation d'expression de Snail¹⁶³, tout comme pour des lignées MCF-7 soumise à une hypoxie plus stricte (0,1 % d'O₂)¹⁶⁴. Cependant, même si l'on remarque une certaine augmentation de Snail en hypoxie sévère dans notre modèle, cette augmentation n'est pas significative (Fig. 21).

Si on parcourt la littérature, on observe que dans d'autres conditions expérimentales une hypoxie très sévère (0,1% d'O₂) induit une diminution d'expression de l'E-cadhérine dans des cellules MCF-7 après 8 h, mais la diminution d'expression s'effectue de manière plus marquée à partir de 24 h, pour ne plus être détectée en western blot après 72 h¹⁶⁴. En ce qui concerne Bmi1, une surexpression de la protéine dans des cellules rénales cancéreuses (HK-2) a également été observée en réponse à l'hypoxie sévère (1% d'O₂) après 12 h¹⁶⁵. L'acquisition de marqueurs de l'EMT va parfois de pair avec l'augmentation d'expression de Sox2, Nanog et CD44, des marqueurs de CSCs¹⁶⁶. Cette relation entre marqueurs de l'EMT et des CSCs n'est cependant encore que peu étudiée dans le BC.

Cette augmentation d'expression en hypoxie sévère de la vimentine est cohérente avec les données de la littérature, montrant une augmentation de l'expression de la vimentine suivant la culture de cellules cancéreuses mammaires (MDA-MB-231 et MDA-MB-468) en hypoxie très sévère (0,1% O₂)¹⁶⁴. Dans d'autres modèles cellulaires (pancréas¹⁶⁷ et endothélium¹⁶⁸), il a également été montré de l'hypoxie (3% d'O₂) induisait l'augmentation d'expression de la vimentine dans d'autres modèles cellulaires mais dans le cadre du BC l'effet de l'hypoxie 1 ou 5% n'est pas encore, à notre connaissance, étudié.

Dans notre modèle, l'augmentation d'expression des gènes codant pour Snail et pour la vimentine pourrait suggérer que la formation des MS est associée à une activation de l'EMT. Cette hypothèse peut être valable même si tous les marqueurs investigués ne varient pas dans le sens d'une EMT. Il est connu dans le cas du cancer du sein que la diminution d'expression de l'E-cadhérine par exemple n'est pas obligatoire pour la progression vers un phénotype mésenchymateux¹⁶⁹.

À la vue des tous ces résultats présentés, il est raisonnable de penser que le modèle mis en place permet bien un enrichissement en CSCs dans les MS, enrichissement qui serait accompagné d'EMT. Cette vérification est importante car il est connu que certaines lignées cellulaires ne permettent pas l'établissement de sphères et que le nombre de sphères formées est dépendant de la lignée utilisée et des conditions expérimentales^{90,93,170}. Par exemple, Stéphanie Meunier (thèse en cours) a récemment montré que la densité cellulaire avait un impact important sur la SFE de différentes lignées couramment utilisées dans la littérature comme les MCF-7 et T47D. Ses résultats suggèrent qu'à des densités relativement élevées les cellules différenciées s'agrègent et survivent en condition de culture non adhérente (résultats non publiés).

La deuxième partie de notre travail a consisté en l'étude d'ER- α dans les MS de 24 h. Il est depuis longtemps connu que ce récepteur nucléaire joue un rôle important dans la croissance des tumeurs mammaires, le surexprimant dans 70 % des cas¹⁴. Cette surexpression favorise la croissance de la tumeur et, à ce jour, les thérapies pour ce sous-type de cancer passent principalement par un ciblage précis de ce récepteur. De plus, ER- α est connu comme favorisant l'activité des CSCs par une augmentation de l'expression d'Oct4, Sox2 ou encore Gli1, un membre de la voie du Sonic Hedgehog (Shh)¹¹⁹⁻¹²¹. L'hypoxie est également connue comme régulant négativement l'expression d'ER- α en diminuant la transcription du gène et en augmentant la dégradation protéasome-dépendante de la protéine^{113,114}. De manière intéressante, les résultats préliminaires de notre équipe (non publiés) montrent un phénomène

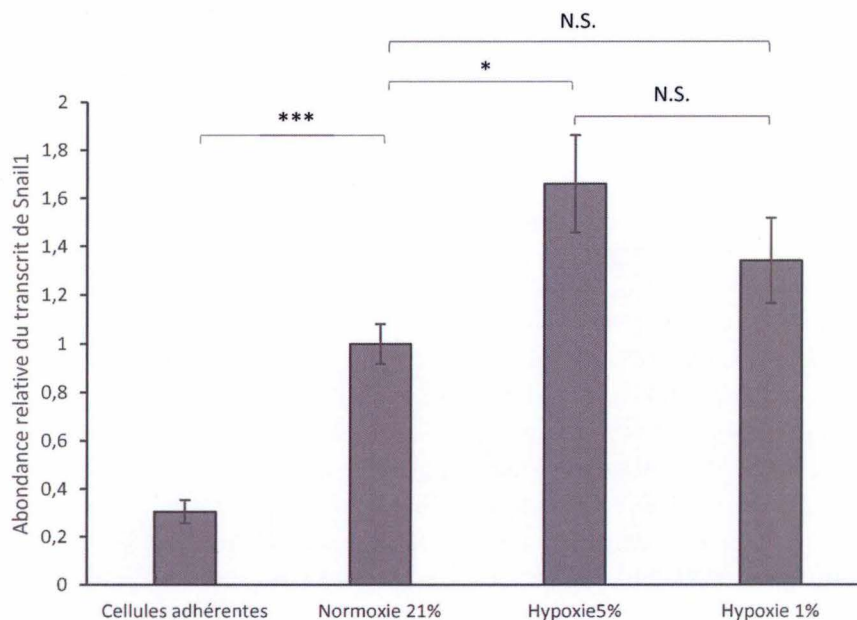


Figure 21 Analyse de l'expression relative de l'ARNm de Snail1 dans des cellules MCF-7 adhérentes et des MS incubés 24 h en normoxie ou hypoxie. L'ARN total extrait des cellules adhérentes ou des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à Snail1 et de SYBR Green. L'actine-β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'expression d'ARNm des sphères de 1 jour \pm SEM (MS n=9, cellules adhérentes n=3). * : Significativement différent de l'expression dans les MS1 incubés en normoxie ($p < 0,05$), N.S. : Non significatif, déterminé par une ANOVA I suivie d'une comparaison multiple de Tukey (Normoxie vs Hypoxie). *** : Différence d'expression très hautement significative ($p < 0,001$) entre cellules adhérentes et MS1 incubées en normoxie, déterminé par un test de Student.

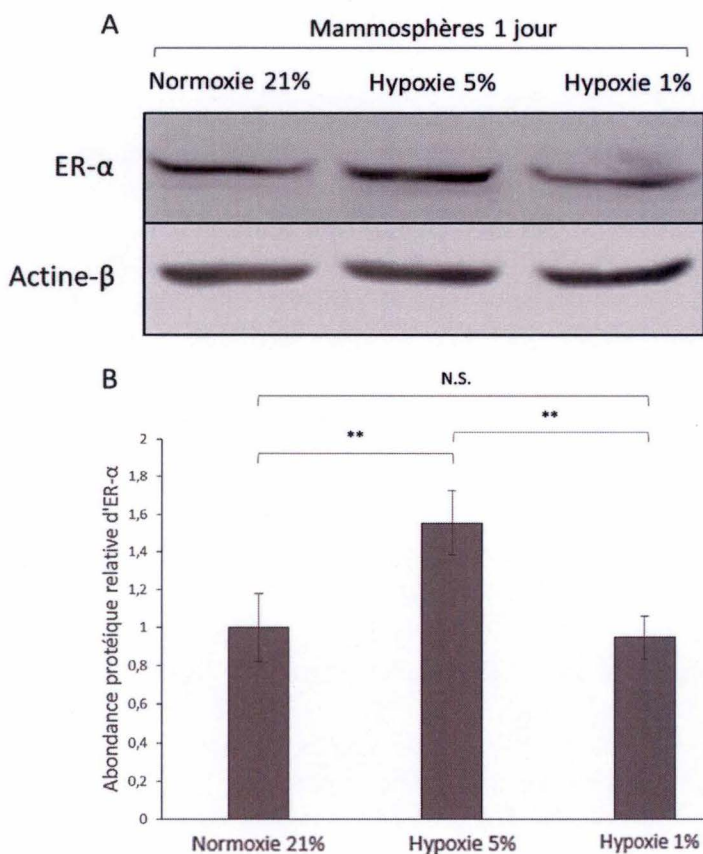


Figure 22 Analyse de l'abondance d'ER-α dans des MS incubés 24 h en normoxie ou en hypoxie. (A) L'abondance d'ER-α a été analysée par Western blot de 20 µg de protéines d'un lysat clair de cellules adhérentes ou de sphères de 24 h cultivées en normoxie (21% O₂), hypoxie modérée (5% O₂) et sévère (1% O₂). La détection a été réalisée grâce à un anticorps primaire anti-ER-α de souris. La charge protéique a ensuite été vérifiée par immunodétection de l'actine-β par un anticorps monoclonal anti-actine-β de souris. Cet anticorps primaire a ensuite été détecté par un anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué au fluorochrome IRDYE 680. L'image représente des expériences réalisées en triplicats. (B) Quantification de l'intensité de fluorescence émise par les bandes correspondantes à ER-α, mesurée par le programme Odyssey. Les valeurs sont normalisées par rapport à la β-actine. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence et normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence en normoxie. Ils représentent la moyenne \pm 1 écart-type (n=5). ** : Très significativement différent de l'intensité obtenue dans les MS de 24 h en normoxie ($p < 0,01$) déterminé par une ANOVA I suivie d'un test de comparaison multiple de Tukey. N.S. : Non significatif

non décrit dans la littérature. Nous avons pu déterminer que des MS incubés en hypoxie sévère montrent une diminution d'expression comme prévu, mais que des MS incubés en hypoxie modérée semblent réguler positivement l'expression du récepteur au niveau transcriptionnel et au niveau de l'abondance protéique. Suivant cela, nous avons décidé d'étudier le rôle que pouvait jouer l'hypoxie sur les CSCs au travers d'ER- α .

4. Analyse de l'effet de l'hypoxie modérée et sévère sur l'expression et l'activité d'ER- α dans des sphères incubées pendant 24 h en normoxie et hypoxie

A. Influence de la concentration en oxygène sur l'abondance protéique et du transcrit

Il est connu que l'hypoxie affecte l'abondance d'ER- α dans les cellules, suite à deux mécanismes distincts : une dégradation protéasomale augmentée et une diminution de l'expression du gène *ESR1*, codant pour ER- α ^{113,114}. Les expériences préliminaires de ce mémoire ont eu pour but de déterminer si cet effet de l'hypoxie était conservé dans le modèle des MS. L'abondance protéique et du transcrit d'ER- α ont donc été étudiées, en western blot et en RT-qPCR respectivement. La figure 22A montre une image représentative du western blot d'ER- α . La quantification de l'intensité des bandes (Fig. 22B) montre que l'abondance de la protéine augmente significativement quand les MS sont incubées pendant 24 h en hypoxie modérée. L'hypoxie sévère n'a pas le même effet puis que l'abondance d'ER- α est équivalente à celle en normoxie. La quantification du signal nous indique une abondance plus forte de la protéine à 5% d'oxygène.

Ces résultats suggérant que l'abondance d'ER- α augmente dans des MS incubées pendant 24 h en hypoxie modérée et pas hypoxie sévère, nous avons continué notre travail en analysant l'expression du gène *ESR1* par RT-qPCR.

L'expression du transcrit d'ER- α dans les sphères n'est significativement pas le même suivant le niveau d'oxygène. On observe une augmentation significative de l'abondance de l'ARNm dans les MS cultivées 24 h en hypoxie modérée et une diminution en hypoxie sévère (Fig. 23). Les différences d'expression observées ne dépassent pas les 30% donc l'impact biologique de ces différences est peut-être limité. Il a précédemment été décrit que l'activation d'HIF-1 α est associée à une diminution de l'expression du gène codant pour ER- α mais aussi à une augmentation de sa dégradation protéolytique ^{113,114}. La diminution de l'abondance de la protéine du récepteur nucléaire en hypoxie sévère dans notre modèle pourrait donc résulter d'une augmentation de dégradation d'ER- α dans les MS. Il n'est cependant pas exclu que d'autres mécanismes interviennent. L'effet attendu de l'hypoxie sévère n'étant pas observé, nous avons cherché à vérifier la stabilisation et l'activation de HIF-1 α , médiant la diminution d'expression d'ER- α ¹¹³.

Dans ce but, des cellules MCF-7 ont été incubées en normoxie ainsi qu'en hypoxie modérée et sévère. Comme contrôle positif, les cellules ont également été incubées en présence d'un inhibiteur du protéasome, le MG-132, et/ou avec un agent imitant l'hypoxie, le CoCl₂ ¹⁷¹. Comme attendu, la protéine HIF-1 α n'est pas détectable en normoxie (Fig. 24). Par contre, son abondance augmente de manière drastique quand les cellules sont incubées en présence de chlorure de cobalt et de MG-132. Il est normal d'observer un signal dans ces conditions étant donné qu'en imitant l'hypoxie on réduit l'hydroxylation d'HIF-1 α par la PHD et qu'en plus de ça, en inhibant le protéasome, la dégradation de la protéine n'est plus possible. Dans

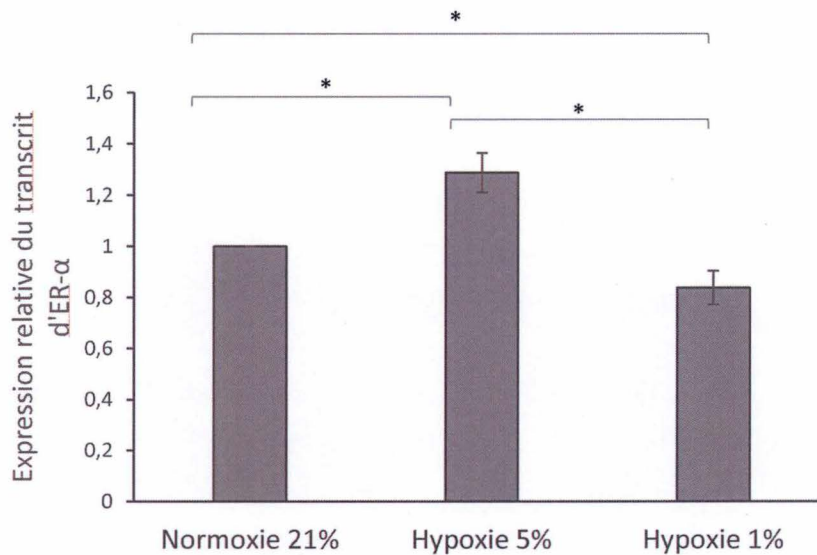


Figure 23 Analyse de l'expression relative de l'ARNm d'ER-α dans des MS de 24 h incubés en normoxie ou hypoxie. L'ARN total extrait des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère, a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à ER-α et de SYBR Green. L'actine-β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'expression d'ARNm des sphères de 24 h +/- SEM (n=9). *: Significativement différent ($p < 0,05$), **: très significativement différent ($p < 0,01$) de l'expression obtenue dans les MS en normoxie, déterminé par une ANOVA à mesures répétées suivie par une comparaison multiple de Tukey.

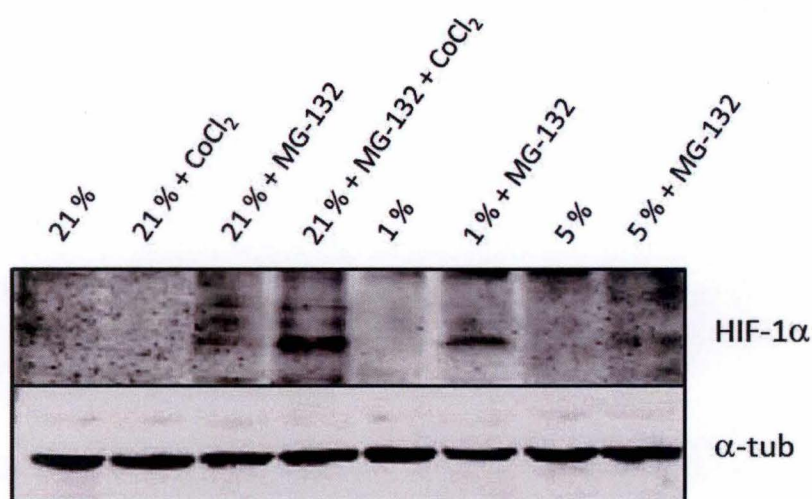


Figure 24 Analyse de l'abondance d'HIF-1α. L'abondance de HIF-1α a été analysée par Western blot de 40 µg de protéines d'un lysat clair de cellules adhérentes traitées avec ou sans CoCl_2 (200 µM) et MG-132 (10 µM) et sous différentes concentration en oxygène, 21%, 5% et 1% d' O_2 . Le CoCl_2 est un agent chimique reproduisant des conditions d'hypoxie sévère, alors que le MG-132 est un inhibiteur du protéasome. La détection a été réalisée grâce à des anticorps primaires anti-HIF-1α de souris. La charge protéique a ensuite été vérifiée par immunodétection de l'actine-β par un anticorps monoclonal anti-actine-β de souris. Cet anticorps primaire a ensuite été détecté par un anticorps secondaire anti-IgG de souris conjugué au fluorochrome IRDYE 680.

les conditions d'hypoxie modérée et sévère, la protéine n'est pas non plus détectée dans nos conditions expérimentales. Cependant, si on ajoute du MG-132 dans le milieu, la détection d'HIF-1 α devient possible. Le plus intéressant est que l'abondance de la protéine est bien plus importante en hypoxie sévère avec MG-132 suggérant, comme attendu, une plus grande stabilisation de l'isoforme dans cette condition. Il semblerait également qu'il soit possible de détecter un signal faible dans les cellules incubées en normoxie et d'hypoxie modérée avec du MG-132 pendant 24 h. On pourrait s'attendre à ce qu'un signal apparaisse dans ces conditions vu que la voie de dégradation du protéasome est inhibée. Quoi qu'il en soit, le signal observé dans ces deux conditions est beaucoup moins fort que celui détecté en hypoxie sévère et MG-132.

B. Influence de la concentration en oxygène sur l'activité du récepteur

Les expériences précédentes suggérant que l'hypoxie sévère et modérée induisent respectivement une diminution et une augmentation d'abondance de ER- α , nous avons voulu savoir si ces différences pouvaient avoir un impact sur l'activité du récepteur. Nous avons donc transfecté des cellules MCF-7 adhérentes avec un plasmide rapporteur codant pour une luciférase, sous contrôle d'un promoteur synthétique répondant à ER- α grâce à trois régions ERE successives. L'activité du récepteur a ensuite été analysée dans les MS de 24 h par le dosage de l'activité de la luciférase, celle-ci étant proportionnelle à l'activité transcriptionnelle d'ER- α . Cette mesure a été effectuée dans deux conditions expérimentales : à l'état basal et en réponse à une stimulation par l'E₂.

L'activité du récepteur à l'état basal est présentée à la Fig. 25A et est exprimée en pourcentage de l'activité dans les MS à 21% d'O₂. De manière intéressante, on observe une diminution significative (de l'ordre de 30%) de l'activité de ER- α dans des MS incubées en hypoxie modérée ou sévère pendant 24 h. Ce résultat peut paraître surprenant car rappelons qu'à l'état basal, les cellules sont cultivées durant trois jours dans un milieu sans rouge phénol et dont le sérum a été traité au charbon actif ce qui permet de réduire la concentration d'hormones stéroïdiennes de plus de 50% et d'arriver à une concentration finale de moins de 10 pg/ml¹⁷² (voir Matériel et méthodes, point 1), de telle sorte que les cellules n'entrent qu'un minimum en contact avec des hormones stéroïdiennes. Cependant, ER- α peut être activé par des voies de signalisation alternatives à la liaison d'E₂. Notamment, ER- α peut être activé grâce à une phosphorylation de sa sérine 118 résultant de l'interaction avec le récepteur de l'IGF-1 activé ou bien par l'action des MAP kinases, elles-mêmes activées en réponse à l'activation de l'EGFR par exemple^{30,31}. Une autre possibilité est l'activation de la PKA en réponse à une augmentation de la concentration en AMPc. La PKA peut phosphoryler la protéine CARM1 ce qui permet à la protéine d'interagir directement avec ER- α et d'activer ce dernier³². Etant donné qu'à l'état basal on observe une diminution de l'activité du récepteur en hypoxie, les voies alternes d'activation pourraient être impliquées. De plus, cette diminution d'activité est comparable en hypoxie modérée et sévère alors que dans ces deux conditions nous venons de montrer qu'il existe une différence d'expression de la protéine, plus élevée en hypoxie modérée que sévère. Dans cet état basal, la différence d'activité observée en hypoxie pourrait alors sans doute être liée à l'influence de l'hypoxie sur l'une des voies alternes décrite. La diminution d'activité en hypoxie pourrait également être due à une modification post-traductionnelle du récepteur diminuant ainsi son activité. Il est connu que de nombreuses modifications du récepteurs sont possibles, certaines diminuant son activité transcriptionnelle¹⁷³.

Nous avons ensuite mesuré l'activité du récepteur en réponse à une incubation de 24 h

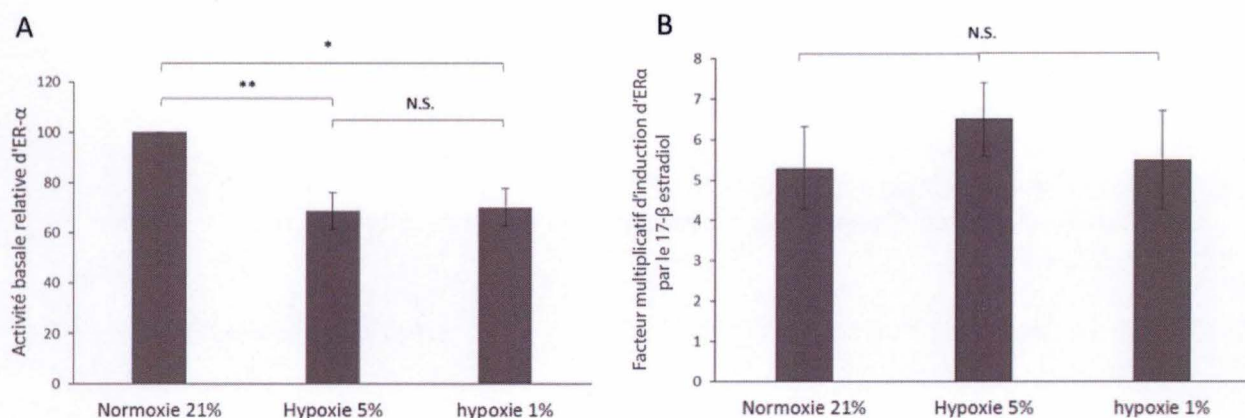


Figure 25 Analyse des effets de l'hypoxie sur l'activité et l'activation d'ER-α dans MS incubés 24 h en normoxie et en hypoxie. (A) Analyse de l'activité relative du récepteur nucléaire à l'état basal. Des MCF-7 ont été transfectées de manière transitoire avec un plasmide rapporteur exprimant une luciférase sous contrôle d'un promoteur répondant à l'ER-α ainsi qu'avec un plasmide pRL-TK pour la normalisation. 24 h après la transfection, les cellules ont été ensemencées en conditions non-adhérentes pour permettre la formation de sphères et incubées en normoxie (21% O₂), en hypoxie modérée (5% O₂) ou en hypoxie sévère (1% O₂). L'activité des luciférases a été mesurée 24 h plus tard sur les lysats de sphères, selon la méthode décrite dans la section matériel et méthodes. Les résultats reflètent le pourcentage d'activité basal obtenu pour les MS 1 jour en normoxie et représentant la moyenne \pm SEM (n=6). * et **: Significativement différent de l'activité basale en normoxie (p<0,05 et p<0,01 respectivement) déterminé par une ANOVA 1 suivie d'un test de Tukey. N.S.: Non significatif. (B) Analyse de l'activité d'ER-α dans des MS incubés pendant 24 h en présence d'E₂ à une concentration de 10 nM. L'activité du récepteur en présence d'E₂ est exprimée en fonction de l'activité basale et représente la moyenne des facteurs multiplicatifs d'induction \pm SEM (n=6). N.S.: Non significatif, déterminé par une ANOVA 1 suivie d'un test de Tukey.

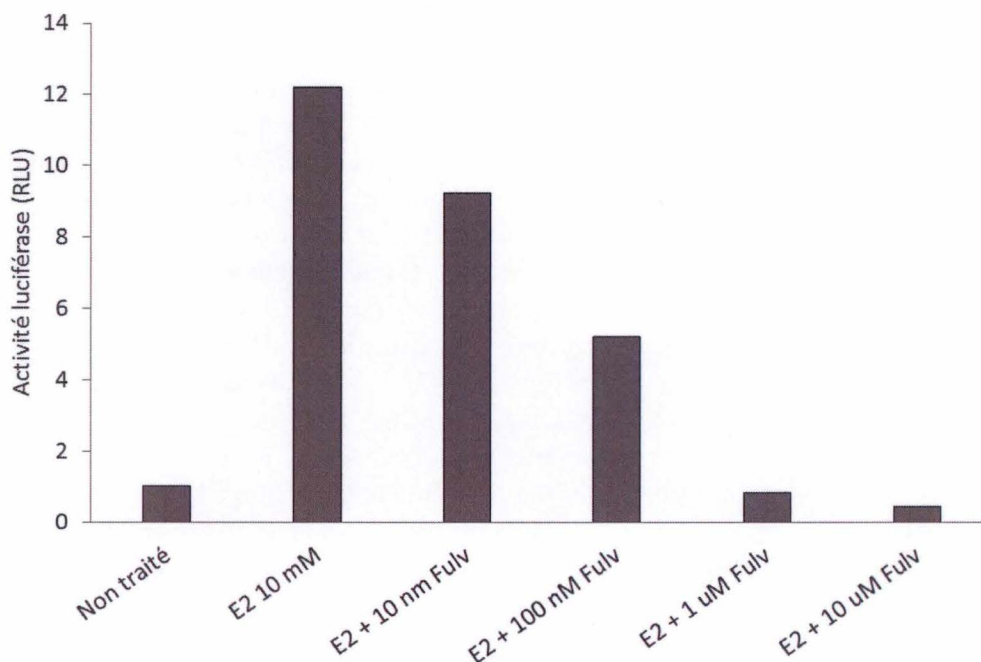


Figure 26 Analyse de l'activité d'ER-α dans des MS de cellules MCF-7 incubés pendant 24 h en présence d'E₂ à une concentration de 10 nM et d'une concentration croissante en Fulvestrant. Des cellules MCF-7 ont été transfectées de manière transitoire avec un plasmide rapporteur exprimant une luciférase sous contrôle d'un promoteur répondant à l'ER-α, ainsi qu'avec un plasmide pRL-TK pour la normalisation. 24 h après la transfection, les cellules ont été ensemencées en conditions non-adhérentes pour permettre la formation de sphères et incubées en normoxie (21% O₂), en hypoxie modérée (5% O₂) ou en hypoxie sévère (1% O₂), en présence d'E₂ à une concentration de 10 nM et une concentration croissante en Fulvestrant. L'activité des luciférases a été mesurée 24 h plus tard sur les lysats de sphères, selon la méthode décrite dans la section matériel et méthodes. (n=2)

en présence d'E₂ à une concentration de 10 nM. Cette concentration est fréquemment utilisée dans la littérature et suffit à induire l'activation d'ER- α ^{119,174}. Quand les sphères sont incubées avec l'E₂ en hypoxie modérée ou sévère, l'induction du récepteur reste équivalente et ne montre pas de différence significative entre les conditions (Fig. 25B).

5. Analyse de du rôle d'ER- α dans l'expression de marqueurs de CSCs dans des mammosphères incubées pendant 24 h en normoxie et hypoxie

A. Détermination de la concentration de Fulvestrant à utiliser

Afin d'étudier le rôle du récepteur ER- α sur l'expression de certains marqueurs de CSCs, nous avons décidé d'utiliser un antagoniste pur du récepteur, le Fulvestrant (Faslodex ou ICI182780) fréquemment utilisé dans la littérature ^{175,176}. Afin de déterminer la concentration de la molécule requise pour obtenir une inhibition totale de l'activité d'ER- α dans nos MS, des MCF-7 transfectées avec la construction rapportrice ont été exposés à des doses croissantes de Fulvestrant et ensemencés en conditions non-adhérentes. L'activité du récepteur suit comme attendu une courbe décroissante dose-dépendante dans les MS de 24 h (Fig. 26). Dans les différentes expériences réalisées, une concentration de 1 μ M était à chaque fois requise pour entraîner une activité comparable à celle observée dans des cellules non traitées à l'E₂. Cette concentration en Fulvestrant est d'ailleurs utilisée à long terme pour induire la perte d'expression d'ER- α dans des MCF-7 ¹⁷⁷ mais aussi à plus court terme pour inhiber ER- α ¹⁷⁸. Nous avons donc sélectionné cette concentration pour inhiber ER- α . En présence de Fulvestrant, les MCF-7 conservent leur capacité à former des sphères. Les MS ne semblent pas montrer de différences morphologiques par rapport à des sphères contrôles (résultats non montrés).

B. Analyse du rôle d'ER- α dans l'expression de Sox2 et CD44 dans des mammosphères de 24h cultivés en normoxie ou hypoxie

Sachant qu'ER- α peut agir en association avec d'autres facteurs de transcription, il semble intéressant de moduler son activité pour voir si cette modification influe sur l'expression d'autres gènes, et plus globalement sur les CSCs. Ici, l'expression de Sox2 et de CD44 a été mesurée, en réponse à l'activation ou à l'inhibition du récepteur. Grâce à ça, il devrait être possible d'identifier de manière plus précise le rôle du récepteur nucléaire au sein de ces CSCs.

Il est décrit dans la littérature que l'expression de Sox2 est influencée par ER- α . En effet, des cellules adhérentes exposées à 10 nM d'E₂ expriment une plus grande quantité d'ARNm de Sox2, par la répression du miR-140 ¹²⁰. Ces cellules possèderaient alors une plus grande activité des CSCs. Par contre, à l'inverse, un traitement de MS avec la même concentration en E₂ réduirait l'expression de Sox2, menant à une moins grande capacité à former des sphères ¹²⁸. Lorsqu'on incube les MS avec 10 nM d'E₂, on observe une diminution de l'expression du gène codant pour Sox2 d'environ 50%, et ce peu importe la concentration en oxygène dans l'environnement (Fig. 27). Ce résultat concorde avec l'étude de Simões et al. qui montrait également une diminution d'expression d'environ 50% ¹²⁸. De plus, il est intéressant d'observer que l'ajout de Fulvestrant, inhibant ER- α , semble rétablir l'expression de Sox2 à un niveau observé avant le traitement. À l'inverse de Sox2, l'expression de CD44 dans

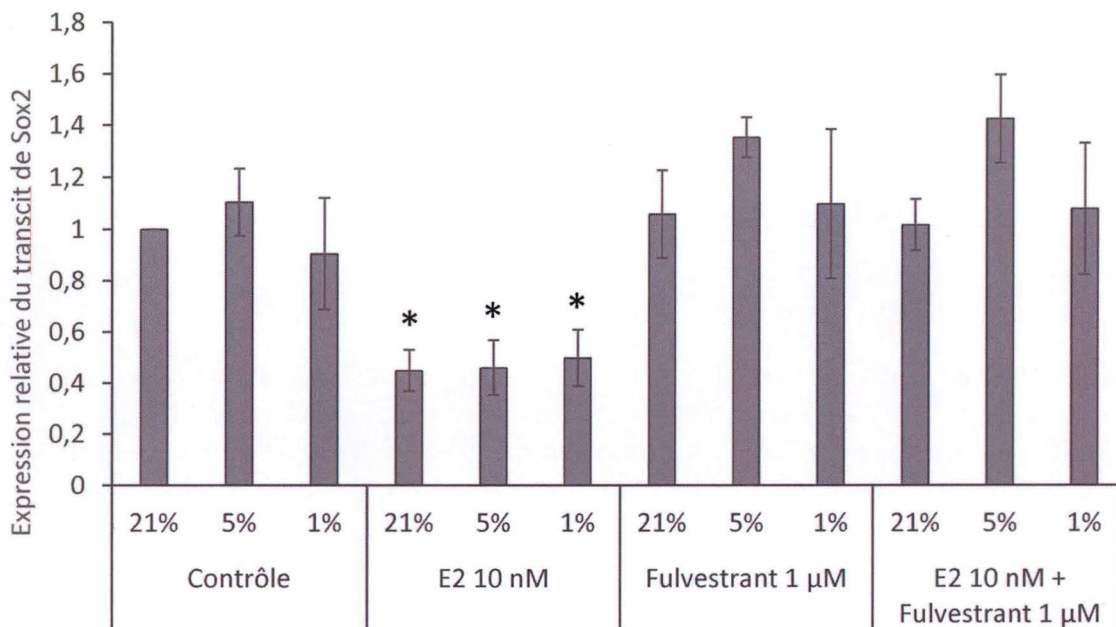


Figure 27 Analyse de l'expression relative de l'ARNm de Sox2 dans des MS de incubés 24 h en normoxie ou en hypoxie et en présence ou non d'E2 et de Fulvestrant. L'ARN total extrait des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère et en présence ou non de 10 nM d'E2 et/ou de 1 µM de Fulvestrant, a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à Sox2 et de SYBR Green. L'actine-β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'abondance d'ARNm des sphères de 24 h non traitées +/- SEM (n=3). * : Significativement différent de l'expression obtenue dans les autres conditions, déterminé par une ANOVA II (p<0,05), Contrôle vs E2, E2 vs Fulvestrant et E2 vs E2 + Fulvestrant

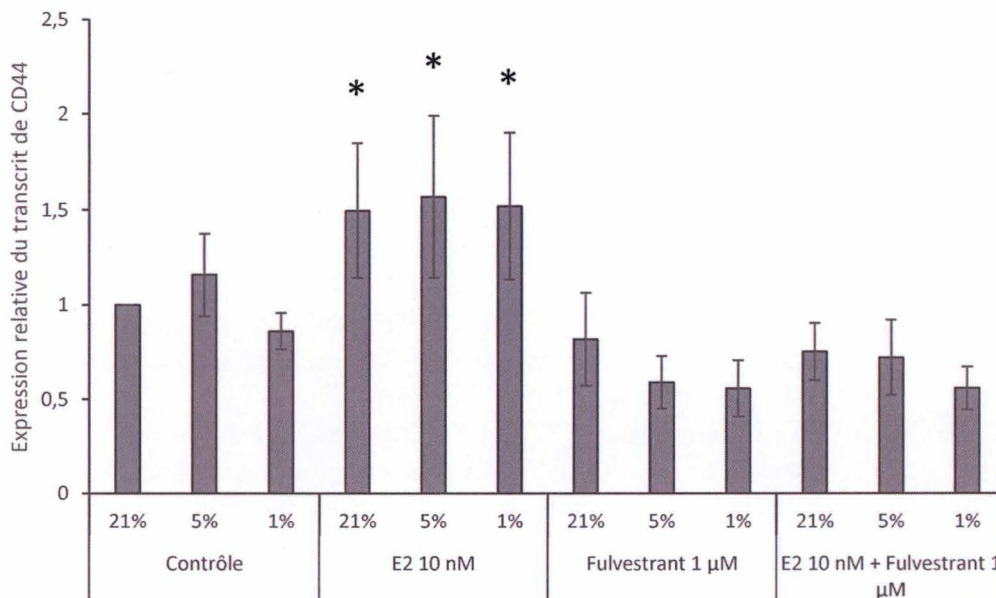


Figure 28 Analyse de l'expression relative de l'ARNm de CD44 dans des MS de incubés 24 h en normoxie ou en hypoxie et en présence ou non d'E2 et de Fulvestrant. L'ARN total extrait des sphères de 24 h incubées en normoxie, hypoxie modérée ou sévère et en présence ou non de 10 nM d'E2 et/ou de 1 µM de Fulvestrant, a été rétro-transcrit en ADNc. 0,025 µg d'ADNc a été amplifié par une PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR), en présence d'amorces spécifiques à CD44 et de SYBR Green. L'actine-β a été utilisée comme gène de référence pour la normalisation. Les résultats sont exprimés en tant que moyenne des folds d'induction de l'abondance d'ARNm des sphères de 24 h non traitées +/- SEM (n=3). * : Significativement différent de l'expression obtenue dans la condition Fulvestrant 1 µM et E2 10 nM + Fulvestrant 1 µM, obtenu par une ANOVA II.

les MS incubés avec 10 nM d'E₂ semble augmentée et au contraire, diminuée en présence de Fulvestrant seul ou avec E₂ (Fig. 28). Ces modifications d'expression ne semblent pas affectées par le pourcentage en oxygène présent dans l'environnement étant donné qu'aucune différence significative n'a pu être mise en avant. La diminution d'expression de Sox2 observée en présence d'E₂ semble concorder avec la littérature. Il semblerait que l'E₂ diminue le nombre de CSCs au sein du tissu normal et cancéreux, reflété par une diminution du nombre de mammosphères formés ¹²⁸. À l'inverse, en présence d'E₂, l'expression de l'un des marqueurs des CSCs, CD44, semble augmentée, allant en contradiction avec ce qui est proposé pour Sox2. Cependant, il faut le répéter, tous les marqueurs des CSCs ne représentent pas une population identique de cellules donc ces résultats ne sont peut-être pas contradictoires. Il se peut que le pool de CSCs soit bien diminué mais plutôt remplacé par des progéniteurs exprimant plus fortement CD44 mais légèrement plus différenciés.

Conclusions et perspectives

Touchant au moins une femme sur 8 dans le monde, le cancer du sein est une pathologie avec une incidence extrêmement élevée. On estime en effet que plus de 1 500 000 nouveaux cas sont détectés chaque année (Globocan, 2012). Les progrès récents de la médecine ont permis d'améliorer la détection mais surtout les techniques de soin, visant à éliminer les tumeurs. Grâce à ces progrès, la mortalité liée au cancer du sein a fortement chuté ces dernières années. En effet, à l'heure actuelle, près de 85 à 90% des patientes sont toujours en vie après 5 ans (National Cancer Institute, 2014). Cependant, dans 40% de ces cas, le cancer réapparaît sous forme d'un cancer du sein secondaire, ou bien de métastases distantes, et s'avère plus agressif et, surtout, résistant aux thérapies ¹⁷⁹. Il reste donc de nombreux progrès à réaliser, principalement dans la lutte contre la récurrence.

Depuis plusieurs années, le concept des cellules souches cancéreuses (CSCs) a émergé et propose une piste de réponse à la récurrence du cancer. Ce type de cellule possède en effet des caractéristiques semblables à celles des cellules souches « classiques », c'est-à-dire l'auto-renouvellement et la différenciation, mais également des caractéristiques propres faisant d'elles actuellement le centre d'attention des chercheurs. En effet, il a été montré que les CSCs possèdent une résistance aux traitements chimio- et radio-thérapeutiques beaucoup plus importante que les cellules cancéreuses différenciées. De plus, des études récentes suggèrent que les CSCs sont capables de se disséminer dans l'organisme pour former des métastases dans des organes distants ⁹⁴. L'existence des CSCs a été démontrée dans divers cancers, notamment le cancer du sein ⁶⁵. Depuis lors, la recherche accorde une importance croissante à ces cellules et la recherche de traitements s'oriente de plus en plus vers le ciblage de ce type cellulaire ⁴⁵.

Un autre acteur jouant un rôle essentiel dans le développement du BC est ER- α (surexprimé dans environ 70 % des cancers du sein ¹⁴). Ce récepteur nucléaire est impliqué notamment dans la croissance de la glande mammaire en réponse aux œstrogènes sécrétés. En effet, une fois activé, il joue le rôle de facteur de transcription et contrôle l'expression de gènes associés à la croissance des cellules, à la survie et à la progression du cycle cellulaire. Étant donné que son action dote la cellule de capacités répliquatives et de survie importantes, les thérapies aujourd'hui utilisées ciblent celui-ci ¹⁸⁰. En plus, il a été montré qu'ER- α est un régulateur du caractère « souche » des cellules dans le cancer du sein, et qu'en réponse à l'hypoxie (1% d'O₂), fréquente dans une tumeur, l'activité des CSCs serait augmentée par le biais d'ER- α ^{119,120,127,129}. Étant donné qu'il est connu que l'hypoxie modérée (5% d'O₂) peut promouvoir l'activité des CSCs dans d'autres modèles ¹¹⁰, nous nous sommes intéressés ici à l'effet que pourrait avoir ER- α sur la croissance des CSCs et ce, en conditions d'hypoxie modérée et sévère.

Au cours de la première partie de notre travail nous avons mis au point et caractérisé le modèle expérimental dit des mammosphères couramment utilisé dans la littérature pour l'isolation des CSCs à partir de lignées cellulaires et de tumeurs mammaires ¹³⁶. Ce modèle repose sur une propriété essentielle des CSCs qui est de résister à l'anoïkis. La mise en culture des cellules en conditions non-adhérentes permet d'isoler les CSCs car les cellules différenciées meurent par apoptose. Étant donné que dans certaines conditions les cellules peuvent s'agréger et survivre, il est fondamental de caractériser le modèle utilisé pour s'assurer du bon enrichissement en CSCs. En suspension dans le milieu, les CSCs prolifèrent pour former des structures sphéroïdes appelées mammosphères (MS). Le modèle sur lequel

nous nous sommes basés sur la culture de cellules MCF-7, une lignée cancéreuse mammaire luminaire, et la formation de mammosphères à partir de celles-ci. Les analyses sont conduites après 24 h d'incubation des cellules en normoxie, hypoxie modérée (5% d'O₂) ou hypoxie sévère (1% d'O₂). Ce timing pour la formation de sphères a été sélectionné étant donné qu'on sait qu'après 16 h les MS sont enrichis en CSCs et que les expériences décrites dans la littérature reliant l'hypoxie et ER- α décrivent déjà des modifications d'expression génique après 16 h ¹²⁹. Nous avons analysé l'expression de CD44 et Sox2 ainsi que l'abondance de Sox2, Oct4 et de la β -Caténine, 4 marqueurs de CSCs, dans ces MS de 24 h pour vérifier l'enrichissement en CSCs des MS. Ces analyses nous ont permis de montrer une augmentation de l'expression de CD44 dans les MS, quelle que soit la condition d'incubation. Ensuite, l'analyse d'abondance protéique des marqueurs a révélé que les protéines Sox2 et Oct-4 étaient surexprimées dans les MS par rapport aux cellules adhérentes. Oct-4 et Sox2 montraient des différences d'expression entre MS incubées à 21% d'O₂ et à 5% d'O₂, la protéine étant plus exprimée dans cette dernière condition. L'augmentation d'abondance de Sox2 dans les MS de 24 h n'étant pas corrélée à une augmentation d'expression du transcrit, on pourrait suggérer qu'il s'agit plutôt d'une augmentation de la stabilité de la protéine. Il a en effet été décrit que des modifications post-traductionnelles de ce facteur de transcription pouvaient mener à la stabilisation de la protéine. Eventuellement, pour vérifier cette hypothèse on pourrait utiliser un inhibiteur de la synthèse protéique comme le cycloheximide ¹⁸¹. En bloquant la synthèse protéique dans les MS et en analysant l'abondance du facteur de transcription au cours du temps, il serait possible d'établir si la stabilité de Sox2 est équivalente comparée à des cellules adhérentes afin de savoir si l'augmentation d'abondance de la protéine dans les MS de 24 h est belle et bien due à ce mécanisme. Il faudrait de plus vérifier que cet enrichissement se maintient dans le temps, en récoltant des MS à 48 h, 72 h et plus et que les MS ne tendent pas à perdre leur enrichissement en CSCs au cours du temps. Cependant, il est utile de rappeler que selon le modèle utilisé, tous les marqueurs de CSCs utilisés n'indiquent pas d'augmentation dans les MS ⁸⁷. Il aurait été intéressant d'obtenir la mesure de l'abondance de CD44 dans les MS mais des mises au point sont nécessaires pour pouvoir étudier cette protéine en western blot.

Ensuite, nous avons cherché à mesurer l'activité de ces CSCs à l'intérieur des sphères en fonction de l'hypoxie pour confirmer également l'établissement de notre modèle. Pour ça, nous avons mesuré le nombre de sphères formées dans les différentes conditions de normoxie ou d'hypoxie. À partir de ces sphères, appelées sphère primaires (MS1) il est possible de dissocier les cellules et de les ensemercer de nouveau en culture non-adhérente pour former des sphères secondaires (MS2). En étudiant la différence du nombre de MS1 et MS2 on peut mesurer l'activité des CSCs à l'intérieur de celles-ci et mesurer également leur activité d'auto-renouvellement. D'après nos expériences, il apparaît que c'est en hypoxie modérée qu'on peut observer la plus grande augmentation de MS2. Cela suggère que l'activité des CSCs à 5% est augmentée par rapport aux autres conditions. Il semblerait intéressant de savoir quels mécanismes sont impliqués dans cette différence. On sait que les effets de l'hypoxie passent par la stabilisation et l'activation des facteurs de transcription HIF-1 α et HIF-2 α et que surtout, ces deux isoformes sont stabilisées sous des gammes de concentration en oxygène différentes. En hypoxie modérée il se trouve que HIF-2 α est l'isoforme stabilisée ^{111,182}. Il nous faudrait confirmer l'activation d'HIF-2 α dans les MS1 en hypoxie modérée. Des tests ont été réalisés avec un anticorps anti-HIF-2 α mais de plus amples vérifications sont nécessaires avant de pouvoir confirmer cette stabilisation. Étant donné qu'HIF-2 α possède des gènes cibles propres, dont notamment Oct-4 qui régule l'activité d'auto-renouvellement des CSCs, il se peut que la différence d'activité des CSCs dans cette condition soit causée par

HIF-2 α . Pour vérifier ça, il faudrait pouvoir confirmer que dans ces MS, la concentration en oxygène présente favorise une stabilisation et une activation plus importante d'HIF-2 α que dans les autres conditions. S'il s'agit bien de l'isoforme majoritairement présente dans les MS en hypoxie modérée, on pourrait éventuellement cibler HIF-2 α avec un siRNA ou une molécule inhibitrice comme le 4GHi (un antagoniste benzoxadiazole ¹⁸³). Si l'inhibition d'HIF-2 α abroge cette augmentation de MS2 alors cela confirmera son rôle dans le phénomène. Pour également mieux comprendre les facteurs intervenant dans l'augmentation d'activité des CSCs dans les MS en hypoxie modérée, il serait intéressant d'étudier les autres acteurs régulant le caractère souche des cellules, Nanog par exemple. Une activation d'HIF-2 α en hypoxie modérée pourrait éventuellement être reliée à l'augmentation d'expression d'Oct-4 observée dans cette condition d'hypoxie, bien que cela reste à démontrer, par l'inhibition d'HIF-2 α notamment. De plus, il est connu qu'Oct-4 et Sox2 peuvent former un complexe capable d'augmenter l'expression de *Pou5f1*, le gène codant pour Oct-4, mais également du gène codant pour Sox2, créant ainsi une boucle de régulation positive. Ce complexe Oct-4/Sox2 régule également le caractère souche des cellules en activant la transcription de Nanog, un autre gène maintenant l'état pluripotent des cellules ¹⁸⁴. Il se peut donc que l'augmentation d'abondance de ces deux protéines observée au sein des MS puisse favoriser l'auto-renouvellement et l'état indifférencié des CSCs par cette boucle positive.

Un processus fréquemment décrit comme favorisant la formation des CSCs est l'EMT. En effet, par le biais de cette transition, les cellules cancéreuses acquièrent des caractéristiques souches et sont plus à même de former des sphères qu'une population de cellules cancéreuses n'ayant pas subi la transition ¹⁵⁴. Des études suggèrent que l'EMT pourrait, par exemple, provoquer la dédifférenciation des cellules cancéreuses ^{11,69}. Nous nous sommes donc intéressés à ce phénomène au sein des MS de 24 h en normoxie ou en hypoxie en étudiant certains des marqueurs de cette transition : Snail, Bmi-1, l'E-cadhérine et la vimentine. L'augmentation de l'expression de Snail en hypoxie modérée et de la vimentine en hypoxie sévère suggère que l'EMT est présente dans les MS de 24 h, principalement dans celles incubées en normoxie. Pour pouvoir confirmer cela, il serait intéressant d'étudier ces marqueurs au niveau protéique également, par western blot par exemple. S'il s'avérait que l'abondance de la protéine était bien augmentée dans les MS et principalement en hypoxie, nous pourrions alors vérifier notamment l'activité de Snail en tant que facteur de transcription, par un rapporteur luciférase par exemple. Pour pouvoir confirmer ce processus, il faudrait éventuellement vérifier l'expression et l'abondance d'autres marqueurs liés à l'EMT, notamment la N-cadhérine ou les facteurs de transcription Slug ou Twist ¹⁵⁷. Ensuite, l'EMT dotant les cellules d'une capacité d'invasion du tissu environnant, il pourrait être intéressant de mesurer cette capacité pour les cellules obtenues en hypoxie. Le test d'invasion de matrigel peut, par exemple, mesurer ce processus invasif. La technique a d'ailleurs déjà été testée pour des lignées cellulaires mammaires ¹⁸⁵. Il se pourrait que les cellules en hypoxie, en plus d'une augmentation d'activité des CSCs, acquièrent une meilleure capacité d'invasion des tissus par l'EMT. Étant donné que c'est un processus requérant une séquence d'étapes, il semblerait intéressant de vérifier la progression de l'EMT au cours du temps et de ne pas s'arrêter à de MS de 24 h mais plutôt étendre ça à une cinétique de MS.

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons étudié ER- α . Nous nous sommes intéressés à la régulation en hypoxie de l'expression de son transcrit et de son abondance protéique, mais aussi à son activité. En effet, des résultats préliminaires générés au laboratoire suggéraient qu'en hypoxie modérée on assiste à une augmentation de l'expression du transcrit et de l'abondance d'ER- α . Nous avons donc commencé par étudier l'abondance du récepteur dans les MS en normoxie ou en hypoxie modérée et sévère. Les résultats nous laissent pen-

ser qu'il existe bien une augmentation d'abondance à 5% d'O₂ mais pas de diminution à 1%. Ensuite, en ce qui concerne l'expression du transcrit d'ER- α , la même tendance est observée avec une augmentation en hypoxie modérée mais cette fois une diminution en hypoxie sévère. Notons tout de même que cette différence d'expression n'est pas élevée (20 à 30% par rapport à la normoxie). Il serait intéressant d'étudier ce phénomène dans des MS à des temps plus longs pour voir si cette différence se maintient, s'accroît ou disparaît. Le phénomène décrit par notre laboratoire, concernant la diminution d'expression et d'abondance en hypoxie sévère, pourrait en fait s'établir à plus long terme. Les résultats du laboratoire montrent que le nombre de CSCs diminue au cours du temps. Étant donné qu'on observe une modification d'expression d'ER- α , il serait intéressant de vérifier si l'augmentation du nombre de sphères secondaires observée en hypoxie se maintient si celles-ci sont incubées durant des temps plus longs. Pour comprendre d'où vient ce phénomène, il faudrait trouver quel mécanisme est responsable de cette augmentation. Cela pourrait résulter d'une augmentation de la transcription du gène *ESR1* ou bien d'une augmentation de la stabilité du transcrit lui-même. Pour répondre à cette question on pourrait vérifier le taux de transcription d'*ESR1* en utilisant un plasmide rapporteur, dans lequel un gène codant pour une luciférase serait sous contrôle du promoteur d'*ESR1*. Dans l'hypothèse d'une augmentation de la stabilité du transcrit, en inhibant la transcription par l'actinomycine-D¹⁸⁶, par exemple, et en analysant l'abondance du transcrit à différents temps après inhibition, on pourrait voir apparaître des différences entre les conditions. Il pourrait être intéressant d'identifier le mécanisme par lequel l'hypoxie induit cette différence d'expression. Il faudrait aussi confirmer que c'est bien l'isoforme HIF-2 α qui médie cette augmentation, éventuellement par son inhibition.

Après avoir analysé l'expression et l'abondance du récepteur, nous avons étudié son activité dans les différentes conditions d'hypoxie et de normoxie. Pour ça, une construction rapportrice codant pour une luciférase sous contrôle d'un promoteur répondant à ER- α a été transfectée de manière transitoire dans les cellules. De manière surprenante, l'activité du récepteur à l'état basal est diminuée en hypoxie, sans distinction entre modérée et sévère. Il est connu que des voies alternatives à l'activation du récepteur, voies ligand-indépendantes, peuvent entrer en jeu pour l'activation d'ER- α . Il semblerait ainsi qu'en hypoxie celles-ci soient affectées et que donc ER- α également. Il pourrait être utile de savoir quelle voie en particulier, si pas plusieurs, affecte l'activité d'ER- α . Nous les avons citées plus tôt, il en existe plusieurs comme celles des facteurs de croissance IGF et EGF, mais aussi la voie passant par la kinase PKA. Sachant que ces trois voies activent le récepteur par sa phosphorylation, il pourrait être possible de vérifier que cette différence d'activité est liée à une différence dans le taux de phosphorylation d'ER- α , observable en western blot.

Enfin, la partie la plus importante de cette étude pour comprendre le rôle d'ER- α dans la croissance des CSCs est sans doute celle de l'inhibition du récepteur. Grâce à l'activation, par l'E₂ et l'inhibition par le Fulvestrant d'ER- α , il est possible de mettre en évidence un lien entre le récepteur et la croissance des CSCs. Pour ça, nous avons étudié l'expression de certains gènes des CSCs en réponse à la modulation d'activité d'ER- α . Les résultats de cette expérience nous montrent que l'activation d'ER- α par 10 nM d'E₂ induit une diminution d'expression de Sox2, le facteur de transcription des cellules souches. CD44 par contre montre une augmentation d'expression une fois les MS exposées à l'E₂. Sur base de ces résultats, il serait intéressant de vérifier si l'activation/inhibition d'ER- α pouvait mener à une meilleure capacité à former des sphères, et donc, à une plus grande activité des CSCs étant donné que Sox2, par exemple, est affecté par l'activation d'ER- α et qu'il régule l'auto-renouvellement des CSCs. L'étude d'autres marqueurs de CSCs en réponse à cette modulation serait également nécessaire à la compréhension des mécanismes impliquant ER- α dans la croissance des CSCs.

Bibliographie

1. Visvader JE, Lindeman GJ. The unmasking of novel unipotent stem cells in the mammary gland. *EMBO J*. 2011;30(24):4858–9. doi:10.1038/emboj.2011.415.
2. Oakes SR, Gallego-Ortega D, Ormandy CJ. The mammary cellular hierarchy and breast cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2014. doi:10.1007/s00018-014-1674-4.
3. Javed A, Lteif A. Development of the human breast. *Semin Plast Surg*. 2013;27(1):5–12. doi:10.1055/s-0033-1343989.
4. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology*. 2008;75(2):75–84. doi:10.1159/000123845.
5. Going JJ, Anderson TJ, Battersby S, MacIntyre CC. Proliferative and secretory activity in human breast during natural and artificial menstrual cycles. *Am J Pathol*. 1988;130(1):193–204. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1880536&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed October 8, 2014.
6. Potten CS, Watson RJ, Williams GT, et al. The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br J Cancer*. 1988;58(2):163–70. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2246757&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed October 8, 2014.
7. Polyak K. Breast cancer : origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007;117(11):3155 – 3163. doi:10.1172/JCI33295.group.
8. Cox A, Dunning AM, Garcia-Closas M, et al. A common coding variant in CASP8 is associated with breast cancer risk. *Nat Genet*. 2007;39(3):352–8. doi:10.1038/ng1981.
9. Easton DF, Pooley K a, Dunning AM, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature*. 2007;447(7148):1087–93. doi:10.1038/nature05887.
10. Polyak K. Science in medicine Breast cancer : origins and evolution. 2007;117(11). doi:10.1172/JCI33295.group.
11. Smalley M, Piggott L, Clarkson R. Breast cancer stem cells: obstacles to therapy. *Cancer Lett*. 2013;338(1):57–62. doi:10.1016/j.canlet.2012.04.023.
12. Hu Z, Fan C, Oh DS, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:96. doi:10.1186/1471-2164-7-96.
13. Brenton JD, Carey L a, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005;23(29):7350–60. doi:10.1200/JCO.2005.03.3845.
14. Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999;17(5):1474–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10334533>.
15. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson J-A, Haldosén L-A. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene*. 2005;24(44):6605–16. doi:10.1038/sj.onc.1208807.
16. Matthews J, Gustafsson J-A. Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv*. 2003;3(5):281–92. doi:10.1124/mi.3.5.281.
17. Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 1997;138(11):4613–21. doi:10.1210/endo.138.11.5496.

18. Driscoll MD, Sathya G, Muyan M, Klinge CM, Hilf R, Bambara RA. Sequence Requirements for Estrogen Receptor Binding to Estrogen Response Elements. *J Biol Chem*. 1998;273(45):29321–29330. doi:10.1074/jbc.273.45.29321.
19. Ruff M, Gangloff M, Marie Wurtz J, Moras D. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res*. 2000;2(5):353–359. doi:10.1186/bcr80.
20. Moghadam SJ, Hanks AM, Keyomarsi K. Breaking the cycle: An insight into the role of ER α in eukaryotic cell cycles. *J Carcinog*. 2011;10:25. doi:10.4103/1477-3163.90440.
21. Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V. Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol Rev*. 2006;58(4):685–704. doi:10.1124/pr.58.4.2.
22. Reid G, Denger S, Kos M, Gannon F. Human estrogen receptor- α : regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci*. 2002;59(5):821–831. doi:10.1007/s00018-002-8470-2.
23. Leclercq G, Lacroix M, Laïos I, Laurent G. Estrogen receptor alpha: impact of ligands on intracellular shuttling and turnover rate in breast cancer cells. *Curr Cancer Drug Targets*. 2006;6(1):39–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16475975>. Accessed November 11, 2014.
24. Bulynko Y a, O'Malley BW. Nuclear receptor coactivators: structural and functional biochemistry. *Biochemistry*. 2011;50(3):313–28. doi:10.1021/bi101762x.
25. Varlakhanova N, Snyder C, Jose S, Hahm JB, Privalsky ML. Estrogen receptors recruit SMRT and N-CoR corepressors through newly recognized contacts between the corepressor N terminus and the receptor DNA binding domain. *Mol Cell Biol*. 2010;30(6):1434–45. doi:10.1128/MCB.01002-09.
26. Landers JP, Spelsberg TC. New concepts in steroid hormone action: transcription factors, proto-oncogenes, and the cascade model for steroid regulation of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1992;2(1):19–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1543897>. Accessed October 14, 2014.
27. Umayahara Y, Kawamori R, Watada H, et al. Estrogen regulation of the insulin-like growth factor I gene transcription involves an AP-1 enhancer. *J Biol Chem*. 1994;269(23):16433–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8206951>. Accessed October 15, 2014.
28. Gururaj AE, Rayala SK, Vadlamudi RK, Kumar R. Novel mechanisms of resistance to endocrine therapy: genomic and nongenomic considerations. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 2):1001s–1007s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2110.
29. Levin ER. Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(10):477–82. doi:10.1016/j.tem.2009.06.009.
30. Lee A V, Weng CN, Jackson JG, Yee D. Activation of estrogen receptor-mediated gene transcription by IGF-I in human breast cancer cells. *J Endocrinol*. 1997;152(1):39–47. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9014838>. Accessed December 8, 2014.
31. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995;270(5241):1491–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7491495>. Accessed December 4, 2014.
32. Carascossa S, Dudek P, Cenni B, Briand P-A, Picard D. CARM1 mediates the ligand-independent and tamoxifen-resistant activation of the estrogen receptor alpha by cAMP. *Genes Dev*. 2010;24(7):708–19. doi:10.1101/gad.568410.
33. Valverius EM, Bates SE, Stampfer MR, et al. Transforming growth factor alpha production and epidermal growth factor receptor expression in normal and oncogene transformed human mammary epithelial cells. *Mol Endocrinol*. 1989;3(1):203–14. doi:10.1210/mend-3-1-203.
34. Altucci L, Addeo R, Cicatiello L, et al. 17beta-Estradiol induces cyclin D1 gene transcription, p36D1-p34cdk4 complex activation and p105Rb phosphorylation during mitogenic stimulation of G(1)-arrested human breast cancer cells. *Oncogene*. 1996;12(11):2315–24. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8649771>. Accessed May 18, 2014.

35. Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50(1):3–22. doi:10.1016/j.critrevonc.2003.09.003.
36. Basu A, Rowan BG. Genes related to estrogen action in reproduction and breast cancer. *Front Biosci*. 2005;10:2346–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15970500>. Accessed May 13, 2014.
37. Jordan VC, O'Malley BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(36):5815–24. doi:10.1200/JCO.2007.11.3886.
38. Jordan VC, Gottardis MM, Satyaswaroop PG. Tamoxifen-stimulated Growth of Human Endometrial Carcinoma. *Ann New-York Acad Sci*. 1991;622(1):439 – 446.
39. Osborne CK, Wakeling A, Nicholson RI. Fulvestrant: an oestrogen receptor antagonist with a novel mechanism of action. *Br J Cancer*. 2004;90 Suppl 1:S2–6. doi:10.1038/sj.bjc.6601629.
40. Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, et al. Comparison of the effects of a pure steroidal antiestrogen with those of tamoxifen in a model of human breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87(10):746–50. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7563152>. Accessed October 19, 2014.
41. Croxtall JD, Mckeage K. Fulvestrant: a review of its use in the management of hormone receptor-positive metastatic breast cancer in postmenopausal women. *Drugs*. 2011;71(3):363–380.
42. Cleator SJ, Ahamed E, Coombes RC, Palmieri C. A 2009 update on the treatment of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2009;9 Suppl 1:S6–S17. doi:10.3816/CBC.2009.s.001.
43. Williams C, Lin C-Y. Oestrogen receptors in breast cancer: basic mechanisms and clinical implications. *Ecancermedicalscience*. 2013;7:370. doi:10.3332/ecancer.2013.370.
44. Palmieri C, Patten DK, Januszewski A, Zucchini G, Howell SJ. Breast cancer: current and future endocrine therapies. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(1):695–723. doi:10.1016/j.mce.2013.08.001.
45. Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Birnbaum D. Targeting breast cancer stem cells: fishing season open! *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):312. doi:10.1186/bcr2636.
46. DeOme KB, Faulkin LJ, Bern HA, Blair PB. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res*. 1959;19(5):515–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13663040>. Accessed September 26, 2014.
47. Alvi AJ, Clayton H, Joshi C, et al. Functional and molecular characterisation of mammary side population cells. *Breast Cancer Res*. 2003;5(1):1–8. doi:10.1186/bcr547.
48. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature*. 2006;439(7072):84–8. doi:10.1038/nature04372.
49. Welm BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert T a, Rosen JM, Goodell M a. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol*. 2002;245(1):42–56. doi:10.1006/dbio.2002.0625.
50. Mollenhauer J, Knoop A, Bak M, et al. Breast cancer stem cells: a moving target for cancer nanomedicine. *Eur J Nanomedicine*. 2012;4(2-4):59–72. doi:10.1515/ejnm-2012-0006.
51. Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(11):832–44. doi:10.1038/nrc1212.
52. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006;441(7097):1075–9. doi:10.1038/nature04957.
53. Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011;71(13):4640–52. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-3320.
54. Lin SY, Xia W, Wang JC, et al. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(8):4262–6. doi:10.1073/pnas.060025397.

55. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res.* 2001;61(16):6050–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11507052>. Accessed December 8, 2014.
56. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, et al. The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene.* 1999;18(18):2883–91. doi:10.1038/sj.onc.1202627.
57. Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med.* 2013;17(1):30–54. doi:10.1111/jcmm.12004.
58. Leis O, Eguara A, Lopez-Arribillaga E, et al. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene.* 2012;31(11):1354–65. doi:10.1038/onc.2011.338.
59. Weina K, Utikal J. SOX2 and cancer: current research and its implications in the clinic. *Clin Transl Med.* 2014;3(1):19. doi:10.1186/2001-1326-3-19.
60. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(5):193–7. doi:10.1016/j.tem.2004.05.011.
61. Nguyen L V, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(2):133–43. doi:10.1038/nrc3184.
62. Clarkson B, Fried J, Strife A, Sakai Y, Ota K, Ohkita T. Studies of cellular proliferation in human leukemia.III. Behavior of leukemic cells in three adults with acute leukemia given continuous infusions of 3H-thymidine for 8 or 10 days. *Cancer.* 1970;25(6):1237–1260. doi:10.1002/1097-0142(197006)25:6<1237::AID-CNCR2820250602>3.0.CO;2-7.
63. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004;432(7015):396–401. doi:10.1038/nature03128.
64. Chan KS, Espinosa I, Chao M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(33):14016–21. doi:10.1073/pnas.0906549106.
65. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(11):3983 – 3988.
66. Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci.* 2004;117(Pt 3):373–80. doi:10.1242/jcs.00954.
67. Jaggupilli A, Elkord E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:708036. doi:10.1155/2012/708036.
68. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H. Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review. *Cancer Treat Rev.* 2012;38(1):68–75. doi:10.1016/j.ctrv.2011.04.002.
69. Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(4):573–7. doi:10.1016/j.biocel.2011.12.020.
70. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004;51(1):1–28. doi:10.1016/j.critrevonc.2004.04.007.
71. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871–90. doi:10.1016/j.cell.2009.11.007.
72. Iliopoulos D, Hirsch HA, Wang G, Struhl K. Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(4):1397–402. doi:10.1073/pnas.1018898108.
73. Ginestier C, Wicinski J, Cervera N, et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. *Cell Cycle.* 2009;8(20):3297–302. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2861502&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 5, 2014.

74. Yu F, Yao H, Zhu P, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007;131(6):1109–23. doi:10.1016/j.cell.2007.10.054.
75. Tanei T, Morimoto K, Shimazu K, et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin Cancer Res*. 2009;15(12):4234–41. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1479.
76. Cojoc M, Mäbert K, Muders MH, Dubrovskaya A. A role for cancer stem cells in therapy resistance: Cellular and molecular mechanisms. *Semin Cancer Biol*. 2014. doi:10.1016/j.semcancer.2014.06.004.
77. Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2004;22(7):1142–51. doi:10.1634/stemcells.2004-0170.
78. Singh S, Brocker C, Koppaka V, et al. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic Biol Med*. 2013;56:89–101. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010.
79. Zhang M, Behbod F, Atkinson RL, et al. Identification of tumor-initiating cells in a p53-null mouse model of breast cancer. *Cancer Res*. 2008;68(12):4674–82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6353.
80. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Birnbaum D. Breast cancer stem cells: tools and models to rely on. *BMC Cancer*. 2009;9:202. doi:10.1186/1471-2407-9-202.
81. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, et al. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(39):14228–33. doi:10.1073/pnas.0400067101.
82. Montanaro F, Liadaki K, Schiendia J, Flint A, Gussoni E, Kunkel LM. Demystifying SP cell purification: viability, yield, and phenotype are defined by isolation parameters. *Exp Cell Res*. 2004;298(1):144–54. doi:10.1016/j.yexcr.2004.04.010.
83. Moreb JS, Ucar D, Han S, et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact*. 2012;195(1):52–60. doi:10.1016/j.cbi.2011.10.007.
84. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, et al. Identification of a primitive brain-derived neural stem cell population based on aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells*. 2006;24(4):975–85. doi:10.1634/stemcells.2005-0217.
85. Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature*. 2006;439(7079):993–7. doi:10.1038/nature04496.
86. Irollo E, Pirozzi G. CD133: to be or not to be, is this the real question? *Am J Transl Res*. 2013;5(6):563–81. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3786264&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed November 5, 2014.
87. Liu Y, Nenutil R, Appleyard M V, et al. Lack of correlation of stem cell markers in breast cancer stem cells. *Br J Cancer*. 2014;110(8):2063–71. doi:10.1038/bjc.2014.105.
88. Croker AK, Goodale D, Chu J, et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. *J Cell Mol Med*. 2009;13(8B):2236–52. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00455.x.
89. Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*. 1992;255(5052):1707–10. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1553558>. Accessed October 21, 2014.
90. Shaw FL, Harrison H, Spence K, et al. A detailed mammosphere assay protocol for the quantification of breast stem cell activity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2012;17(2):111–7. doi:10.1007/s10911-012-9255-3.
91. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast

- cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005;65(13):5506–11. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0626.
92. Valent P, Bonnet D, De Maria R, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(11):767–75. doi:10.1038/nrc3368.
 93. Smart CE, Morrison BJ, Saunus JM, et al. In vitro analysis of breast cancer cell line tumourspheres and primary human breast epithelia mammospheres demonstrates inter- and intrasphere heterogeneity. Engler AJ, ed. *PLoS One.* 2013;8(6):e64388. doi:10.1371/journal.pone.0064388.
 94. Geng S-Q, Alexandrou AT, Li JJ. Breast cancer stem cells: Multiple capacities in tumor metastasis. *Cancer Lett.* 2014. doi:10.1016/j.canlet.2014.03.036.
 95. Vuoriluoto K, Haugen H, Kiviluoto S, et al. Vimentin regulates EMT induction by Slug and oncogenic H-Ras and migration by governing Axl expression in breast cancer. *Oncogene.* 2011;30(12):1436–48. doi:10.1038/onc.2010.509.
 96. Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review. *Cancer Res.* 1989;49(23):6449–6465. Available at: http://cancerres.aacrjournals.org/content/49/23/6449.abstract?ijkey=c0ef7468c-0842fb818eace9e398445d6c647152e&keytype=tf_ipsecsha. Accessed October 30, 2014.
 97. Vaupel P. Tumor microenvironmental physiology and its implications for radiation oncology. *Semin Radiat Oncol.* 2004;14(3):198–206. doi:10.1016/j.semradonc.2004.04.008.
 98. Brahimi-Horn MC, Pouyssegur J. Oxygen, a source of life and stress. *FEBS Lett.* 2007;581(19):3582–91. doi:10.1016/j.febslet.2007.06.018.
 99. Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 2003;17(2):271–3. doi:10.1096/fj.02-0445fje.
 100. Heikkilä M, Pasanen A, Kivirikko KI, Myllyharju J. Roles of the human hypoxia-inducible factor (HIF)-3 α variants in the hypoxia response. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(23):3885–901. doi:10.1007/s00018-011-0679-5.
 101. Keith B, Johnson RS, Simon MC. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer.* 2012;12(1):9–22. doi:10.1038/nrc3183.
 102. Peng X-H, Karna P, Cao Z, Jiang B-H, Zhou M, Yang L. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and hypoxia-inducible factor-1 α signal pathways increases resistance to apoptosis by up-regulating survivin gene expression. *J Biol Chem.* 2006;281(36):25903–14. doi:10.1074/jbc.M603414200.
 103. Stoeltzing O, Liu W, Reinmuth N, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α , vascular endothelial growth factor, and angiogenesis by an insulin-like growth factor-I receptor autocrine loop in human pancreatic cancer. *Am J Pathol.* 2003;163(3):1001–11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868239&tool=pmcentrez&render-type=abstract>. Accessed October 29, 2014.
 104. Tonra JR, Corcoran E, Deevi DS, et al. Prioritization of EGFR/IGF-IR/VEGFR2 combination targeted therapies utilizing cancer models. *Anticancer Res.* 2009;29(6):1999–2007. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19528458>. Accessed October 29, 2014.
 105. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(10):721–32. doi:10.1038/nrc1187.
 106. Hu C-J, Wang L-Y, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Mol Cell Biol.* 2003;23(24):9361–9374. doi:10.1128/MCB.23.24.9361-9374.2003.
 107. Covello KL, Kehler J, Yu H, et al. HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 2006;20(5):557–70. doi:10.1101/gad.1399906.
 108. Skuli N, Liu L, Runge A, et al. Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α -

- pha) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood*. 2009;114(2):469–77. doi:10.1182/blood-2008-12-193581.
109. Schödel J, Oikonomopoulos S, Ragoussis J, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Mole DR. High-resolution genome-wide mapping of HIF-binding sites by ChIP-seq. *Blood*. 2011;117(23):e207–17. doi:10.1182/blood-2010-10-314427.
 110. Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009;15(6):501–13. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018.
 111. Nilsson H, Jögi A, Beckman S, Harris AL, Poellinger L, Pålman S. HIF-2alpha expression in human fetal paraganglia and neuroblastoma: relation to sympathetic differentiation, glucose deficiency, and hypoxia. *Exp Cell Res*. 2005;303(2):447–56. doi:10.1016/j.yexcr.2004.10.003.
 112. Uchida T, Rossignol F, Matthay MA, et al. Prolonged hypoxia differentially regulates hypoxia-inducible factor (HIF)-1alpha and HIF-2alpha expression in lung epithelial cells: implication of natural antisense HIF-1alpha. *J Biol Chem*. 2004;279(15):14871–8. doi:10.1074/jbc.M400461200.
 113. Ryu K, Park C, Lee Y. Hypoxia-inducible factor 1 alpha represses the transcription of the estrogen receptor alpha gene in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;407(4):831–6. doi:10.1016/j.bbrc.2011.03.119.
 114. Cho J, Kim D, Lee S, Lee Y. Cobalt chloride-induced estrogen receptor alpha down-regulation involves hypoxia-inducible factor-1alpha in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2005;19(5):1191–9. doi:10.1210/me.2004-0162.
 115. Kurebayashi J, Otsuki T, Moriya T, Sonoo H. Hypoxia reduces hormone responsiveness of human breast cancer cells. *Jpn J Cancer Res*. 2001;92(10):1093–101. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11676860>. Accessed November 2, 2014.
 116. Mabeesh NJ, Amir S. Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histol Histo-pathol*. 2007;22:559–572.
 117. Milosevic M, Warde P, Ménard C, et al. Tumor hypoxia predicts biochemical failure following radiotherapy for clinically localized prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(7):2108–14. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2711.
 118. Jerabek S, Merino F, Schöler HR, Cojocaru V. OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1839(3):138–54. doi:10.1016/j.bbaggm.2013.10.001.
 119. Jung J-W, Park S-B, Lee S-J, Seo M-S, Trosko JE, Kang K-S. Metformin represses self-renewal of the human breast carcinoma stem cells via inhibition of estrogen receptor-mediated OCT4 expression. *PLoS One*. 2011;6(11):e28068. doi:10.1371/journal.pone.0028068.
 120. Zhang Y, Eades G, Yao Y, Li Q, Zhou Q. Estrogen receptor α signaling regulates breast tumor-initiating cells by down-regulating miR-140 which targets the transcription factor SOX2. *J Biol Chem*. 2012;287(49):41514–22. doi:10.1074/jbc.M112.404871.
 121. Sun Y, Wang Y, Fan C, et al. Estrogen promotes stemness and invasiveness of ER-positive breast cancer cells through Gli1 activation. *Mol Cancer*. 2014;13(1):137. doi:10.1186/1476-4598-13-137.
 122. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr Biol*. 2007;17(2):165–72. doi:10.1016/j.cub.2006.11.033.
 123. Heiden KB, Williamson AJ, Doscas ME, et al. The sonic hedgehog signaling pathway maintains the cancer stem cell self-renewal of anaplastic thyroid cancer by inducing snail expression. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014;99(11):E2178–87. doi:10.1210/jc.2014-1844.
 124. Chang H-H, Chen B-Y, Wu C-Y, et al. Hedgehog overexpression leads to the formation of prostate cancer stem cells with metastatic property irrespective of androgen receptor expression in the mouse model. *J Biomed Sci*. 2011;18(1):6. doi:10.1186/1423-0127-18-6.
 125. Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pålman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol*. 2005;16(4-5):554–63. doi:10.1016/j.semcdb.2005.03.007.

126. Fillmore CM, Gupta PB, Rudnick J a, et al. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21737–42. doi:10.1073/pnas.1007863107.
127. Harrison H, Simões BM, Rogerson L, Howell SJ, Landberg G, Clarke RB. Oestrogen increases the activity of oestrogen receptor negative breast cancer stem cells through paracrine EGFR and Notch signalling. *Breast Cancer Res*. 2013;15(2):R21. doi:10.1186/bcr3396.
128. Simões BM, Piva M, Iriondo O, et al. Effects of estrogen on the proportion of stem cells in the breast. *Breast Cancer Res Treat*. 2011;129(1):23–35. doi:10.1007/s10549-010-1169-4.
129. Harrison H, Rogerson L, Gregson HJ, Brennan KR, Clarke RB, Landberg G. Contrasting hypoxic effects on breast cancer stem cell hierarchy is dependent on ER- α status. *Cancer Res*. 2013;73(4):1420–33. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2505.
130. McCord AM, Jamal M, Shankavaram UT, Lang FF, Camphausen K, Tofilon PJ. Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol cancer Res*. 2009;7(4):489–97. doi:10.1158/1541-7786.MCR-08-0360.
131. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(2):150–61. doi:10.1016/j.stem.2010.07.007.
132. Wang R, Lv Q, Meng W, et al. Comparison of mammosphere formation from breast cancer cell lines and primary breast tumors. *J Thorac Dis*. 2014;6(6):829–37. doi:10.3978/j.issn.2072-1439.2014.03.38.
133. Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83(8):2496–500. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=323325&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>. Accessed May 9, 2014.
134. Green B, Leake RE. Steroid hormones: A practical approach. *Biochem Educ*. 1987;16(1):213 – 214. doi:10.1016/0307-4412(88)90038-6.
135. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73.
136. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev*. 2003;17(10):1253–70. doi:10.1101/gad.1061803.
137. Harrison H, Farnie G, Howell SJ, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch4 receptor. *Cancer Res*. 2010;70(2):709–18. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1681.
138. Liu K, Lin B, Zhao M, et al. The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell Signal*. 2013;25(5):1264–71. doi:10.1016/j.cellsig.2013.02.013.
139. Yoon J, Park M, Lee JH, Min BS, Ryoo S. Endothelial nitric oxide synthase activation through obacunone-dependent arginase inhibition restored impaired endothelial function in ApoE-null mice. *Vascul Pharmacol*. 2014;60(3):102–9. doi:10.1016/j.vph.2014.01.006.
140. Fang L, Zhang L, Wei W, et al. A methylation-phosphorylation switch determines Sox2 stability and function in ESC maintenance or differentiation. *Mol Cell*. 2014;55(4):537–51. doi:10.1016/j.molcel.2014.06.018.
141. Yin X, Xiang T, Li L, et al. DACT1, an antagonist to Wnt/ β -catenin signaling, suppresses tumor cell growth and is frequently silenced in breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2013;15(2):R23. doi:10.1186/bcr3399.
142. Fodde R, Brabletz T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*. 2007;19(2):150–8. doi:10.1016/j.ceb.2007.02.007.
143. Kim R-J, Nam J-S. OCT4 Expression Enhances Features of Cancer Stem Cells in a Mouse Model of Breast Cancer. *Lab Anim Res*. 2011;27(2):147–52. doi:10.5625/lar.2011.27.2.147.

144. Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011;7(2):292–306. doi:10.1007/s12015-010-9208-4.
145. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555–67. doi:10.1016/j.stem.2007.08.014.
146. Jeong C-H, Cho Y-Y, Kim M-O, et al. Phosphorylation of Sox2 cooperates in reprogramming to pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2010;28(12):2141–50. doi:10.1002/stem.540.
147. Singec I, Knoth R, Meyer RP, et al. Defining the actual sensitivity and specificity of the neurosphere assay in stem cell biology. *Nat Methods.* 2006;3(10):801–806. doi:10.1038/NMETH926.
148. Jessberger S, Clemenson GD, Gage FH. Spontaneous fusion and nonclonal growth of adult neural stem cells. *Stem Cells.* 2007;25(4):871–4. doi:10.1634/stemcells.2006-0620.
149. Renner WA, Jordan M, Eppenberger HM, Leist C. Cell-cell adhesion and aggregation: Influence on the growth behavior of CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* 1993;41(2):188–93. doi:10.1002/bit.260410204.
150. Ogawa M, Parmley T, Bank HL, Spicer SS. Human Marrow erythropoiesis in culture. I. Characterization of Methylcellulose Colony assay. *Blood.* 1976;48(3).
151. Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y. Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *J Biomed Mater Res.* 1989;23(1):125–33. doi:10.1002/jbm.820230110.
152. Schwab LP, Peacock DL, Majumdar D, et al. Hypoxia-inducible factor 1 α promotes primary tumor growth and tumor-initiating cell activity in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012;14(1):R6. doi:10.1186/bcr3087.
153. Morrison BJ, Hastie ML, Grewal YS, et al. Proteomic comparison of mcf-7 tumoursphere and monolayer cultures. Lau ATY, ed. *PLoS One.* 2012;7(12):e52692. doi:10.1371/journal.pone.0052692.
154. Mani SA, Guo W, Liao M-J, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell.* 2008;133(4):704–15. doi:10.1016/j.cell.2008.03.027.
155. Han X-Y, Wei B, Fang J-F, et al. Epithelial-mesenchymal transition associates with maintenance of stemness in spheroid-derived stem-like colon cancer cells. Camussi G, ed. *PLoS One.* 2013;8(9):e73341. doi:10.1371/journal.pone.0073341.
156. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1429–37. doi:10.1172/JCI36183.
157. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420–8. doi:10.1172/JCI39104.
158. Kauffhold S, Bonavida B. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention. *J Exp Clin Cancer Res.* 2014;33:62. doi:10.1186/s13046-014-0062-0.
159. Mendez MG, Kojima S-I, Goldman RD. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J.* 2010;24(6):1838–51. doi:10.1096/fj.09-151639.
160. Yang M-H, Hsu DS-S, Wang H-W, et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol.* 2010;12(10):982–92. doi:10.1038/ncb2099.
161. Paranjape AN, Balaji SA, Mandal T, et al. Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog. *BMC Cancer.* 2014;14:785. doi:10.1186/1471-2407-14-785.
162. Pervin S, Hewison M, Braga M, et al. Down-regulation of vitamin D receptor in mammospheres: implications for vitamin D resistance in breast cancer and potential for combination therapy. Lee JW, ed. *PLoS One.* 2013;8(1):e53287. doi:10.1371/journal.pone.0053287.
163. Zhang L, Huang G, Li X, et al. Hypoxia induces epithelial-mesenchymal transition via activation of SNAI1 by hypoxia-inducible factor -1 α in hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.*

- 2013;13(1):108. doi:10.1186/1471-2407-13-108.
164. Lundgren K, Nordenskjöld B, Landberg G. Hypoxia, Snail and incomplete epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Br J Cancer*. 2009;101(10):1769–81. doi:10.1038/sj.bjc.6605369.
 165. Du R, Xia L, Ning X, et al. Hypoxia-induced Bmi1 promotes renal tubular epithelial cell-mesenchymal transition and renal fibrosis via PI3K/Akt signal. *Mol Biol Cell*. 2014;25(17):2650–9. doi:10.1091/mbc.E14-01-0044.
 166. Huang Y-J, Hsu S-H. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like phenotypes within chitosan-hyaluronan membrane-derived 3D tumor spheroids. *Biomaterials*. 2014;35(38):10070–9. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.09.010.
 167. Lei J, Ma J, Ma Q, et al. Hedgehog signaling regulates hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition and invasion in pancreatic cancer cells via a ligand-independent manner. *Mol Cancer*. 2013;12(1):66. doi:10.1186/1476-4598-12-66.
 168. Liu T, Guevara OE, Warburton RR, Hill NS, Gaestel M, Kayyali US. Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299(2):C363–73. doi:10.1152/ajpcell.00057.2010.
 169. Hollestelle A, Peeters JK, Smid M, et al. Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013;138(1):47–57. doi:10.1007/s10549-013-2415-3.
 170. Manuel Iglesias J, Belouqui I, Garcia-Garcia F, et al. Mammosphere formation in breast carcinoma cell lines depends upon expression of E-cadherin. *PLoS One*. 2013;8(10):e77281. doi:10.1371/journal.pone.0077281.
 171. Al Okail MS. Cobalt chloride, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1 α in U251 human glioblastoma cell line. *J Saudi Chem Soc*. 2010;14(2):197–201. doi:10.1016/j.jscs.2010.02.005.
 172. Cao Z, West C, Norton-Wenzel CS, Rej R, Davis FB, Davis PJ. Effects of resin or charcoal treatment on fetal bovine serum and bovine calf serum. *Endocr Res*. 2009;34(4):101–8. doi:10.3109/07435800903204082.
 173. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir J-M, Corbo L. Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev*. 2011;32(5):597–622. doi:10.1210/er.2010-0016.
 174. Berno V, Amazit L, Hinojos C, et al. Activation of estrogen receptor-alpha by E2 or EGF induces temporally distinct patterns of large-scale chromatin modification and mRNA transcription. Jin D-Y, ed. *PLoS One*. 2008;3(5):e2286. doi:10.1371/journal.pone.0002286.
 175. Buzdar AU. Fulvestrant--a novel estrogen receptor antagonist for the treatment of advanced breast cancer. *Drugs Today (Barc)*. 2008;44(9):679–92. doi:10.1358/dot.2008.44.9.1256862.
 176. Cuzzocrea S, Bruscoli S, Crisafulli C, et al. Estrogen receptor antagonist fulvestrant (ICI 182,780) inhibits the anti-inflammatory effect of glucocorticoids. *Mol Pharmacol*. 2007;71(1):132–44. doi:10.1124/mol.106.029629.
 177. Liu H, Wing L, De Los Reyes A, Jordan VC. Long-term fulvestrant treatment results in irreversible loss of estrogen receptor alpha expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Proc Amercian Assoc cancer Res*. 2004;45.
 178. Bhatt S, Xiao Z, Meng Z, Katzenellenbogen BS. Phosphorylation by p38 mitogen-activated protein kinase promotes estrogen receptor α turnover and functional activity via the SCF(Skp2) proteasomal complex. *Mol Cell Biol*. 2012;32(10):1928–43. doi:10.1128/MCB.06561-11.
 179. Ahmad A. Pathways to breast cancer recurrence. *ISRN Oncol*. 2013;2013:290568. doi:10.1155/2013/290568.
 180. Palmieri C, Patten DK, Januszewski A, Zucchini G, Howell SJ. Breast cancer: current and future endocrine therapies. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;382(1):695–723. doi:10.1016/j.mce.2013.08.001.
 181. Zhou P. Determining protein half-lives. *Methods Mol Biol*. 2004;284:67–77. doi:10.1385/1-

- 59259-816-1:067.
182. Li Z, Bao S, Wu Q, et al. Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell*. 2009;15(6):501–13. doi:10.1016/j.ccr.2009.03.018.
183. Scheuermann TH, Li Q, Ma H-W, et al. Allosteric inhibition of hypoxia inducible factor-2 with small molecules. *Nat Chem Biol*. 2013;9(4):271–6. doi:10.1038/nchembio.1185.
184. Rodda DJ, Chew J-L, Lim L-H, et al. Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J Biol Chem*. 2005;280(26):24731–7. doi:10.1074/jbc.M502573200.
185. Katz E, Dubois-Marshall S, Sims AH, et al. An in vitro model that recapitulates the epithelial to mesenchymal transition (EMT) in human breast cancer. *PLoS One*. 2011;6(2):e17083. doi:10.1371/journal.pone.0017083.
186. Perry RP, Kelley DE. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol*. 1970;76(2):127–39. doi:10.1002/jcp.1040760202.